



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOCÈNCIES

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA ANIMAL, BIOLOGIA VEGETAL I ECOLOGIA

UNITAT DE BOTÀNICA

BIOGEOGRAFIA I EVOLUCIÓ DE CAMPANULÀCIES I GERANIÀCIES

EN BIOMES ÀRIDS I MEDITERRANIS D'ÀFRICA

TESI DOCTORAL

SARA GARCÍA ALOY

Barcelona, 2017

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia

Unitat de Botànica

Programa de Doctorat: Biologia i Biotecnologia Vegetal

BIOGEOGRAFIA I EVOLUCIÓ DE CAMPANULÀCIES I GERANIÀCIES

EN BIOMES ÀRIDS I MEDITERRANIS D'ÀFRICA

Memòria presentada per Sara García Aloy per optar al títol de Doctora per la

Universitat Autònoma de Barcelona

Amb el vist-i-plau dels directors i tutor de la tesi:

Dr. Juan José Aldasoro Martín Dra. María Luisa Alarcón Caveró Dra. Cristina Roquet Ruiz

Dr. Llorenç Sáez Gonyalons

Sara García Aloy

Barcelona, 2017

Disseny de la portada i contraportada: Lluís Beltran Carbonell

Il·lustracions: Pilar Aloy Villanueva

*Associeu-vos i sereu forts,
instruïu-vos i sereu lliures,
estimeu-vos i sereu feliços*

—Josep Anselm Clavé

Agraïments

Quasi quatre anys després d'haver començat aquest camí incert, sembla que aquest arriba al seu final. Mirant enrere me n'adono de la rapidesa amb què ha passat el temps i tota la gent que he conegut, m'ha ajudat i acompanyat en aquest viatge i sense la qual no estaria aquí.

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, el Dr. Juan José Aldasoro, la Dra. Marisa Alarcón y la Dra. Cristina Roquet, todo el trabajo, esfuerzo y tiempo que han dedicado a esta tesis. Gracias por confiar en mí y guiarme en este camino. He aprendido mucho de vuestras formas diferentes de hacer y creo que eso me ha hecho crecer como persona. Gracias por contagiarme vuestra pasión por la investigación y la ciencia.

També vull agrair al Dr. Llorenç Sáez, el meu tutor, els consells i recolzament que m'ha ofert durant tot aquest temps. Espero que la teva dedicació es vegi recompensada i satisfeta amb aquesta tesi.

Una menció especial al meu amic i company de l'Institut Botànic de Barcelona, el Dr. Daniel Vitales. Gràcies Dani per tot el suport i per tenir tanta paciència amb mi. Gràcies també per ensenyar-me a treballar amb rigor, a no conformar-me, a ser més forta, i per totes les discussions científiques que hem tingut a l'IBB. He après molt de tu i sempre t'estaré agraïda.

Aquesta tesi s'ha realitzat quasi íntegrament a l'Institut Botànic de Barcelona i vull agrair que se'm donés l'oportunitat de treballar i fer ús de les instal·lacions per dur a terme els experiments necessaris. Vull agrair especialment a la directora de l'IBB, la Dra. Teresa Garnatje, per haver-me acollit en el seu grup de recerca i per totes les facilitats que m'ha donat durant aquest temps. Estic molt contenta d'haver conegut i compartit espai de feina amb gent tan encantadora com l'Airy Gras, la Dra. Sònia Garcia, el Dr. Ugo d'Ambrosio, la Joana Aragay, la Carmen Guerrero, la Dra. Gemma Mas de Xaxars, l'Alex Campoy i la Paula Bonaventura. Una de les experiències més gratificants de la meva etapa a l'Institut Botànic ha estat la participació en els treballs de recerca de batxillerat de la Marta López i el Juan Liébana. Els agraeixo a tots dos l'oportunitat de col·laborar en els seus projectes. He après molt de tots vosaltres.

Vull agrair sincerament a totes les persones que durant la meva estada a l'Institut Botànic han contribuït en major o menor grau al desenvolupament d'aquesta tesi i que sempre m'han tractat amb amabilitat: el Dr. Julià Molero, el Dr. Joan Vallès, en Samuel Pyke, en Miquel Veny, la Dra. Núria Garcia-Jacas, el Dr. Alfonso Susanna, el Dr. Jordi López-Pujol, la Dra. Mercè Galbany, el Dr. Ángel Romo, la Dra. Roser Vilatersana, en Sergi Massó, la Sadia Malik, en Youcef Bougoutaia, en Pau Carnicero, la Sònia Herrando, la Jèssica Requena, la M^a Luisa Gutiérrez, en Fernando Castro, la Pilar Bayón, la Dra. Neus Ibáñez, la Neus Nualart, la Montserrat Roig, la Dra. Noemí Montes, la Dra. Diana Muñiz, la Laura Gavioli, en Jordi Pallàs, la Rosa Fernández, l'Anna M^a Prats, en Carles Burguera, en Carlos Gómez, en Carlos Pérez, en David Pérez, la Dra. Sara Lòpez-Vinyallonga, el Dr. Valentí Rull, la Dra. Núria Canyelles, la Dra. Elisabet Safont, la Karina Barros, en Josep Aurell, la Dra. Maria Pilar Alonso, la Isidora Manso, la Sara García López, l'Ángela Zárata, en Carlos Silva, la María Jiménez, en Jordi Antúnez, la Victoria Fernández, la Carmen Ceballos, en Fernando Gutiérrez, el Dr. Josep Maria Montserrat, i a tota la gent que ha passat per l'Institut Botànic durant aquests anys.

También quiero expresar mi agradecimiento por toda su ayuda a la Dra. Isabel Sanmartín y al Dr. Pablo Vargas del Real Jardín Botánico de Madrid con los que he tenido el placer de realizar diferentes colaboraciones realmente enriquecedoras y productivas. Espero que en el futuro podamos seguir compartiendo trabajos y colaboraciones.

I would like to thank Dr. Gudrun Kadereit for accepting my request for a research stay in the Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. I really appreciate all the dedication and patience that she had with me. I enjoyed very much the time I spent there doing research and learning. Vielen Dank Gudrun! I also would like to thank all the staff of the centre, but specially to Dr. Joachim Kadereit, Dr. Berit Gehrke, Dr. Michael Pirie, Ursula Martiné, Silvia Wienken, Angelika Schmitt, Dr. Christian Uhinck and to my dear colleagues Denise, Marie-Claire, Delphine, Paco, Armin, Katharina, Maximilian, Michael, Malvina and Sandra.

També vull expressar el meu agraïment a totes les persones que m'han facilitat material de geraniàcies i campanulàcies. Amb la vostra col·laboració aquest treball és molt més ric. Agraeixo especialment al Dr. F. Albers, Dr. K. Müller i Dr. J.

Röschenbleck de la Universitat de Münster, Alemanya, per facilitar-me material de *Monsonia*. També agraeixo als següents herbaris i als seus conservadors haver-nos donat accés al seu material: BC, BCN, COI, EA, G, LE, MA, MJG, MO, MSUN, P, PRE, STEU, W i WU.

Voldria donar les gràcies a tots els membres del departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, especialment de la Unitat de Botànica. També vull mostrar el meu agraïment a tot el personal del programa de doctorat de Biologia i Biotecnologia Vegetal, sobretot a la Dra. Charlotte Poschenrieder per resoldre les meves preguntes i donar-me totes les facilitats possibles.

Vull agrair també a tots els companys i companyes dels centres on he fet estades prèvies a aquest projecte de tesi, especialment al Dr. Ramon Dolcet del Centre de Recerca en Agrigenòmica i als Dr. Frantisek Baluska i Dr. Ken Yokawa de l'Institut für Zelluläre & Molekuläre Botanik de la Universitat de Bonn.

Voldria mostrar el meu agraïment a tots els alumnes que he tingut, els quals m'han ensenyat milers de coses durant tots aquests anys. Vull donar les gràcies especialment a la Victòria i al Josep, a la Núria Villaronga i a la família Martínez-Sarrau tots els moments feliços compartits. Gràcies de tot cor pel vostre suport.

Reservo les últimes línies a la gent que forma el pilar fonamental de la meua vida: els meus amics i família. Em sento molt afortunada d'estar envoltada i acomboiada per tots vosaltres. Mil gràcies als meus amics de tota la vida i als que ho sou de fa menys temps. A la Delfi, l'Albert, la Cris, el Nabin, el Dani, la Gery, el Jan, la Naw, l'Edu, el José, la Mónica, el David, la Xènia, la Juli, el Pep, la Miriam, la Presna, la Sara, la Saha, la Frida, la Stavi, l'Eren i el Peter. Per totes les abraçades, llàgrimes, rialles i alegries compartides.

Vull agrair a la meua família -amb aquest nucli tan compacte liderat per la millor matriarca possible: la iaia Pilarín- tota la complicitat i moments únics que hem passat. Mil gràcies als meus pares i a la meua germana per estar sempre al meu costat, per tot l'amor i suport que m'heu donat des de ben petita. Als meus padrins, la Pilar i el Lluís, i als meus tiets, el Joan Miquel i la Sandra. Als meus cosins estimats, el Jordi, la Júlia, l'Anna i la Mariona. Un record especial als que ja no hi

són, però que sempre estan en el meu pensament, l'avi Eduard i la iaia Pilar. Moltes gràcies també a la Diana i al Ramon per tot el recolzament i ànims que m'heu donat en aquesta etapa i en etapes anteriors. I com no, als nostres amics el Roc, el Chester, el Bruc i la Hope!

El meu agraïment més especial al Marc. Per tots els moments que hem passat junts. Per tot el suport i l'amor de cada dia. Per seguir compartint i sumant. Per caminar junts molt més temps. *Come what may.*

Índex

Resum	1
Summary	3
Marc de la tesi doctoral	7
Introducció	9
1. Introducció general	9
1.1. Biogeografia	9
1.2. Filogeografia	11
2. Àfrica	13
2.1. Biomes africans	13
2.2. Història climàtica i geològica d'Àfrica	14
2.3. La <i>Rand Flora</i>	15
2.4. Afinitats biogeogràfiques entre Àfrica i la Macaronèsia	17
3. Objecte d'estudi: campanulàcies i geraniàcies	18
3.1. La família <i>Geraniaceae</i> Jussieu	20
3.2. Relacions filogenètiques de les geraniàcies	21
3.3. Caràcters morfològics i pol·linització de les geraniàcies	23
3.4. Distribució biogeogràfica de les geraniàcies	24
4. La família <i>Campanulaceae</i> Jussieu	26
4.1. Relacions filogenètiques de les campanulàcies <i>s. str.</i>	28
4.2. Caràcters morfològics i pol·linització de les campanulàcies <i>s. str.</i>	28
4.3. Distribució i biogeografia de les campanulàcies	29
Referències bibliogràfiques	32
Organització de la Tesi Doctoral	51
Objectius generals	53
Materials i mètodes	57
1. Materials	57
1.1. Grups d'estudi i mostreig	57
2. Mètodes	57
2.1. Extracció, amplificació i seqüenciació d'ADN	57
2.2. Anàlisi de diversitat genètica i estructura poblacional basades en AFLPs	61
2.3. Anàlisi filogeogràfiques	64
2.4. Models de distribució d'espècies	64
2.5. Evolució de caràcters continus i discrets	66

2.6. Determinació d'isòtops de carboni	67
Referències bibliogràfiques	67

Capítol 1. Diversification, biogeographic history and fruit evolution of Geraniaceae

Abstract	74
1. Introduction	77
2. Materials and Methods	79
2.1. Study group and taxon sampling	82
2.2. DNA sequencing	82
2.3. Phylogenetic inference, dating, diversification analyses and biogeographic inference	83
2.4. Ancestral state reconstruction analyses	84
3. Results	84
3.1. Phylogeny, diversification analyses and biogeographic reconstructions	84
3.2. Changes in habit type and dispersal mode	90
4. Discussion	91
4.1. Diversification and biogeographic history of Geraniaceae	91
4.2. Colonisation and adaptation to different biomes thanks to key innovations	93
5. Conclusions	95
References	96

Capítol 2. Opposite trends in the genus *Monsonia* (Geraniaceae): specialization in the African deserts and range expansions throughout eastern Africa

Abstract	116
1. Introduction	119
2. Materials and Methods	121
2.1. Study group and taxon sampling	125
2.2. DNA sequencing	125
2.3. Phylogenetic dating, diversification analyses, and biogeographic inference	126
2.4. Species distribution modelling, niche quantification and climatic niche evolution	127
2.5. Evolution of morphological traits	129
2.6. Photosynthetic metabolism: carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$)	130

3. Results	131
3.1. Phylogeny, diversification analyses and biogeographic reconstructions	131
3.2. Species distribution models, niche breadth and overlap	133
3.3. Niche evolution	136
3.4. Changes in niche preferences, habit type and dispersal mode	137
3.5. Photosynthetic metabolism: carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$) in <i>Monsonia</i>	139
4. Discussion	140
4.1. Aridification, biome range expansions, and the origin of the African Arid Flora	140
4.2. Ecological divergence and niche specialization explains diversification in <i>Monsonia</i>	142
5. Conclusions	144
References	144

**Capítol 3. Biogeographic history of Afro-Macaronesian bellflowers
(*Azorina*-group, Campanulaceae): searching for climatic refugia
and dispersal routes in Africa**

	168
Abstract	171
1. Introduction	173
2. Materials and Methods	175
2.1. Study group and taxon sampling	175
2.2. DNA sequencing and phylogenetic inference	175
2.3. Dating analyses of the <i>Azorina</i> -group	176
2.4. Biogeographic reconstructions	176
2.5. Life form evolution	177
3. Results	178
3.1. Geographic distribution and endemic species of the <i>Azorina</i> -group	178
3.2. Phylogenetic and historical biogeography reconstructions	178
3.3. BSSVS analyses of migration routes in Africa	181
3.4. Habitat and life form evolution	183
4. Discussion	184
4.1. Colonisation of Africa and the origins of <i>Azorina</i> -group	184
4.2. Location of refugia in North Africa and putative dispersal corridors	184
References	186

**Capítol 4. North-west Africa as a source and refuge area
of plant biodiversity: a case study on *Campanula kremeri*
and *Campanula occidentalis***

	200
Abstract	203
1. Introduction	205
2. Materials and Methods	207
2.1. Study group and sampling	207

2.2. DNA sequencing	207
2.3. Phylogenetic and biogeographical analyses in the <i>Azorina</i> -group	208
2.4. Phylogenetic study of <i>C. kremeri</i> - <i>C. occidentalis</i> lineage	208
2.5. Haplotype and DPA analyses	211
2.6. AFLP genotyping and analyses	211
2.7. Species-distribution modelling	
3. Results	213
3.1. Dated phylogeny and biogeography of the <i>Azorina</i> -group	213
3.2. Phylogenetic study of the lineage <i>C. kremeri</i> - <i>C. occidentalis</i>	214
3.3. Phylogeographical patterns in <i>C. kremeri</i> and <i>C. occidentalis</i>	214
3.4. Species-distribution modelling	218
4. Discussion	218
4.1. North-west Africa as a hub of diversification in Mediterranean plants	218
4.2. Evolutionary origins of <i>Campanula kremeri</i> and <i>C. occidentalis</i>	220
4.3. Colonization of the Canary Islands and climatic extinction	221
5. Conclusions	223
References	224
Síntesi i discussió dels resultats	253
1. Filogènia molecular i reconstrucció biogeogràfica de les geraniàcies	255
2. Diversificació de les geraniàcies, colonització i adaptació a diferents biomes: d'Àfrica a la resta del món	256
3. Dispersions de la flora àrida africana des del sud: el cas de <i>Monsonia</i>	259
4. Factors clau que van afavorir la diversificació i colonització de diferents biomes africans	261
5. El rol del nord d'Àfrica com a font i refugi de diversitat vegetal	263
6. Del continent a les illes: colonització de la Macaronèsia des d'Àfrica	266
Referències	267
Conclusions	275

Resum

Àfrica comprèn dues de les regions més riques en espècies vegetals del nostre planeta: la Regió Florística del Cap i la riba sud de la conca mediterrània. Aquest projecte de tesi doctoral pretén aportar nous coneixements sobre l'evolució de la biodiversitat d'Àfrica, la qual roman poc estudiada malgrat l'elevada riquesa d'espècies que presenta. Així mateix, el treball contribueix al millor coneixement dels processos evolutius de la flora de la riba sud de la mar Mediterrània, la qual ha estat molt menys investigada que la riba nord.

En aquesta tesi hem estudiat els processos de diversificació que han tingut lloc al continent africà, així com els patrons de dispersió entre diferents regions d'Àfrica i àrees adjacents, amb especial èmfasi en els ambients àrids i mediterranis. Per abordar aquests objectius ens hem centrat en dues famílies de plantes vasculares, les campanulàcies i les geraniàcies. Aquestes famílies són presents a tots els continents excepte a l'Antàrtica, però els seus centres de distribució es troben principalment en les regions de clima mediterrani. Per tal d'obtenir una visió més completa dels processos de diversificació, colonització i adaptació d'aquestes espècies a Àfrica, hem investigat les dues famílies a escales macroevolutives i microevolutives.

El nostre primer treball estudia la diversificació i la història biogeogràfica de les geraniàcies i investiga com l'evolució del tipus de fruit hauria facilitat l'expansió de *Geraniaceae* i la colonització de diferents ambients i regions biogeogràfiques. En el segon cas d'estudi, ens hem centrat en el gènere *Monsonia*, pertanyent a les geraniàcies, el qual és un grup quasi exclusivament africà adaptat a ambients mediterranis i àrids. En aquest treball, hem investigat com l'evolució del nínxol ecològic i de la morfologia podrien haver influït en la diversificació del gènere i en la seva història biogeogràfica. El tercer treball reconstrueix els orígens evolutius i la història biogeogràfica del grup *Azorina*, un llinatge de *Campanula* distribuït principalment a Àfrica i Macaronèsia. Aquest estudi ha tingut com a objectiu principal identificar els corredors biogeogràfics de dispersió a Àfrica a escala macroevolutiva, així com esbrinar quines zones haurien constituït refugis durant els períodes climàticament adversos. Finalment, el quart treball es centra

també en el grup *Azorina*; en aquest cas hem realitzat un estudi a escala microevolutiva centrant-nos en el llinatge format per *Campanula kremeri* (distribuïda al nord d'Àfrica i al sud de la península Ibèrica) i *Campanula occidentalis* (endèmica de les illes Canàries) amb el propòsit d'investigar les connexions biogeogràfiques entre les flors d'aquestes regions en èpoques recents.

Summary

Africa harbours two of the richest regions in plant species of our planet: the Cape Floristic Region and the southern shore of the Mediterranean Sea. This PhD project aims to shed new light on the African biodiversity evolution, which remains poorly studied to date despite its high species richness. Moreover, this thesis contributes to a better understanding of the evolutionary processes that took place within the flora of the southern shore of the Mediterranean Sea, which has been much less investigated than the northern one.

Specifically, we studied the diversification processes occurring within Africa, as well as the dispersal patterns between this continent and adjacent zones, with special emphasis on arid and Mediterranean biomes. In order to accomplish these objectives, we focused on two families of vascular plants, Campanulaceae and Geraniaceae. These families inhabit all the continents except Antarctica, but their distribution centres are located in the Mediterranean climatic regions. We investigated both families from a macroevolutionary and a microevolutionary point of view to gain understanding on the processes of diversification, colonisation and adaptation they experienced in Africa.

Our first case study aimed to unravel the diversification and biogeographic history of the family Geraniaceae, and investigated how fruit evolution could have promoted the expansion of Geraniaceae to different environments and biogeographic regions. In the second case study, we focused on the genus *Monsonia* (Geraniaceae), which is an almost exclusively African lineage adapted to arid and Mediterranean environments. In this work, we investigated the evolution of the ecological niche and morphological traits that could have influenced the diversification of the genus and its biogeographic history. The third case study aimed to disentangle the evolutionary origins and the biogeographic history of the *Azorina*-group, a lineage of *Campanula* (Campanulaceae) mainly distributed in North Africa and Macaronesia. The main aim of this study was to identify the dispersal corridors within Africa at a macroevolutionary scale, and to unravel which areas constituted refugia during unfavourable climatic periods. Finally, we conducted a fourth work focusing also in the *Azorina*-group; in this case we

conducted a microevolutionary study that zoomed in the lineage that comprises the species *Campanula kremeri* (distributed in north Africa and the south of the Iberian Peninsula) and *Campanula occidentalis* (endemic to the Canary islands) with the aim to investigate the biogeographic connections between the floras of these regions in recent times.

INTRODUCCIÓ

Marc de la tesi doctoral

Els punts calents de biodiversitat (*hotspots*) són regions del planeta que presenten un elevat nombre d'espècies endèmiques i una elevada taxa de pèrdua d'hàbitat (Myers *et al.*, 2000). Dos dels *hotspots* més importants en biodiversitat de plantes vasculars són: la regió florística del Cap, on es troben prop de 9.000 espècies, de les quals un percentatge molt elevat (69%) són endèmiques; i la conca mediterrània, que conté 22.500 espècies i presenta una proporció d'espècies endèmiques considerable (52%; Mittermeier *et al.*, 2004). Aquesta gran diversitat està en part lligada al fet que les regions àrides i semiàrides del sud d'Àfrica i la Mediterrània constitueixen refugis per a plantes relictas: es tracta de regions amb una relativa estabilitat climàtica, la qual ha afavorit probablement la supervivència i l'intercanvi florístic durant els cicles glacials i interglacials del quaternari, així com l'acumulació de llinatges (Thompson, 1999; 2005; Vargas, 2003; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2010). Un altre factor que pot explicar l'elevada diversitat en aquestes regions és la seva complexa topografia, la qual genera una elevada heterogeneïtat ecològica lligada als gradients altitudinals i a la diversitat edafològica (Molina-Venegas *et al.*, 2016), així com la presència de nombrosos arxipèlags en la Mediterrània. Per altra banda, la ubicació de la conca mediterrània, a la intersecció entre Euràsia i Àfrica, possiblement ha contribuït també a l'arribada de nous llinatges a aquesta regió.

En aquesta tesi doctoral hem estudiat els processos de diversificació i els patrons biogeogràfics històrics en diferents regions d'Àfrica i àrees adjacents (la Macaronèsia i sud d'Europa), amb especial èmfasi en la colonització i adaptació als ambients àrids i mediterranis. La biodiversitat d'Àfrica ha sigut poc estudiada en comparació amb altres zones del planeta, malgrat l'elevada riquesa d'espècies i hàbitats que presenta. D'igual manera, la flora i la fauna de la riba nord de la mar Mediterrània ha estat molt més investigada que la de la riba sud. Per tal d'estudiar els orígens de la biodiversitat a les regions mediterrànies d'Àfrica i les connexions biogeogràfiques amb les àrees adjacents, ens hem centrat en dues famílies, les campanulàcies i les geraniàcies. Aquestes famílies són presents a tots els continents excepte a l'Antàrtica, però els seus centres de distribució es troben

principalment en les regions de clima mediterrani (Figura 1). Les geraniàcies tenen el seu origen a Àfrica (Fiz *et al.*, 2008) i assoleixen la seva màxima diversitat a la conca mediterrània i zones temperades del planeta. Per contra, l'origen de les campanulàcies s'ha descrit a Àsia (Roquet *et al.*, 2009), des d'on van ocórrer posteriors radiacions al sud d'Àfrica i la conca mediterrània. Atès que les campanulàcies contenen un nombre molt elevat d'espècies, prop de 2.400, ens hem centrat en la subfamília *Campanuloideae*, la qual té el seu origen a Àsia (Roquet *et al.*, 2009), mentre que el gènere principal, *Campanula*, es troba àmpliament distribuït a la conca mediterrània.

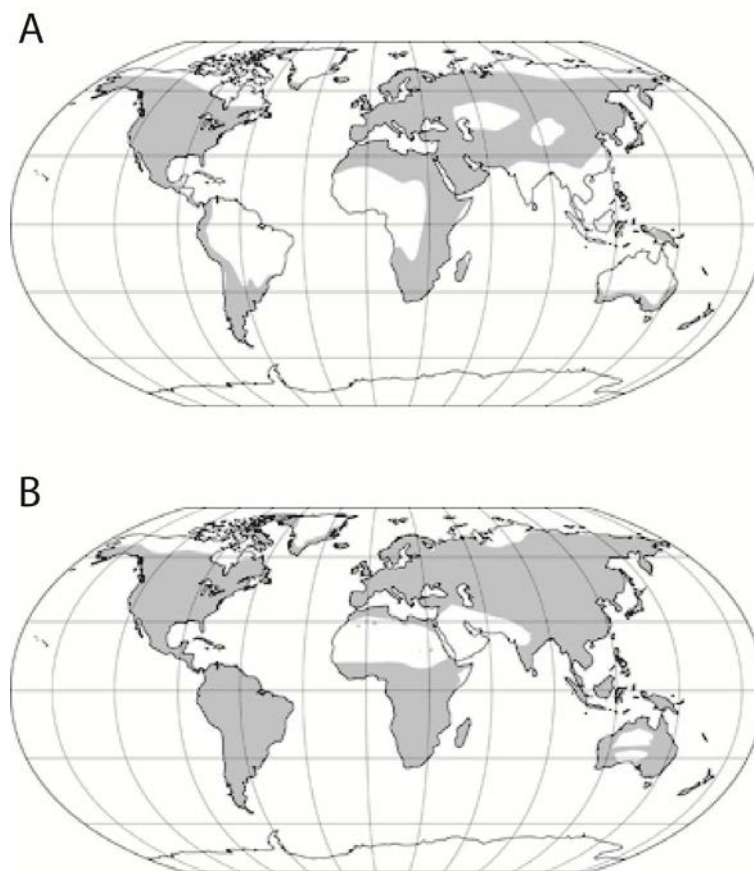


Figura 1. Mapes representant les àrees de distribució de les dues famílies d'estudi, essent A) *Geraniaceae*, i B) *Campanulaceae*.

Més concretament, en aquesta tesi hem investigat quins han estat els principals processos de diversificació, colonització i adaptació a nous ambients a diferents escales evolutives en ambdues famílies. Primerament hem realitzat un estudi centrat en la família de les geraniàcies per tal d'investigar els patrons biogeogràfics i el rol de l'evolució dels caràcters fructífers en la història biogeogràfica i la

diversificació d'aquesta família. A continuació, ens hem centrat en un gènere d'aquesta mateixa família, *Monsonia* (un grup típicament africà adaptat a ambients àrids i mediterranis), i hem investigat com l'evolució del nínxol ecològic i de la morfologia han influït en la diversificació del gènere i en la seva història biogeogràfica. En el tercer cas d'estudi hem reconstruït la història biogeogràfica i les dispersions a través del nord d'Àfrica i la Macaronèsia que van ocórrer entre les espècies del grup *Azorina*, un llinatge de campanetes africanes. Finalment, en el quart treball, hem estudiat des del punt de vista evolutiu i biogeogràfic un llinatge de varies espècies de *Campanula* distribuïdes principalment a Àfrica i la Macaronèsia, i hem dut a terme una investigació aprofundida a escala microevolutiva del llinatge compost per les espècies *Campanula kremeri* (distribuïda al nord d'Àfrica i al sud de la península Ibèrica) i *Campanula occidentalis* (endèmica de les illes Canàries) per tal d'estudiar les connexions entre les flors d'aquestes regions en èpoques recents.

1. Introducció general

1.1. Biogeografia

La biogeografia és la ciència que aspira a documentar i entendre els patrons de distribució espacial de la biodiversitat i els processos subjacents que han generat aquests patrons; és a dir, és l'estudi de la distribució dels organismes, espècies i ecosistemes en l'espai geogràfic i en el temps geològic (Lomolino *et al.*, 2006). La biodiversitat comprèn tota la variabilitat d'organismes vius que habiten la Terra, incloent la diversitat dins de cada espècie, entre les espècies, i dels ecosistemes (Millenium Ecosystem Assessment, 2005). Els diferents elements que constitueixen la biodiversitat sovint varien al llarg de gradients de latitud, altitud, aïllament i àrea de l'hàbitat (Saunders *et al.*, 1991; Lomolino, 2001; Hodkinson, 2005; Wiens i Graham, 2005). Comprendre els orígens evolutius de la biodiversitat així com els patrons espacials de distribució de les espècies és de gran interès per a establir prioritats en matèria de conservació i fer previsions sobre la qualitat dels serveis dels ecosistemes davant el canvi climàtic (Geeta *et al.*, 2014).

La investigació biogeogràfica moderna és una àrea de recerca interdisciplinària que integra dades de camps diferents, tals com les limitacions fisiològiques dels organismes, la seva dispersió, les interaccions interespecífiques i els fenòmens geològics i climatològics que operen a escales espacials globals i en marcs de temps evolutiu. Generalment, es considera que la biogeografia es pot dividir en dues branques principals: la biogeografia ecològica i la biogeografia històrica. La primera se centra majoritàriament en l'estudi de la distribució de la biodiversitat en l'actualitat en funció de factors biòtics i abiòtics contemporanis. En canvi, la biogeografia històrica analitza els patrons de distribució de les espècies tenint en compte també (i amb especial èmfasi) factors històrics tals com canvis climàtics passats (p. ex. cicles glacials i interglacials del plistocè) i fenòmens geològics (p. ex. la deriva dels continents), i factors evolutius com són l'especiació, l'extinció i la dispersió a noves àrees geogràfiques.

De l'elevada complexitat de la biogeografia en deriva la necessitat de subdividir la Terra en diferents zones per poder-la estudiar amb més precisió. Per definir regions biogeogràfiques cal tenir en compte tant les condicions biològiques, físiques i ecològiques, com els fenòmens geològics i evolutius, per identificar les similituds i diferències entre les biotes i el caràcter distintiu de les regions (Mackey *et al.*, 2008; Kreft i Jetz, 2010; Morrone, 2014). En general, la delimitació i cohesió dels conjunts d'espècies dins d'una regió biogeogràfica s'expliquen per la seva incapacitat de sobrepassar barreres físiques i/o ecològiques, a més de la seva adaptació a unes condicions climàtiques i ecològiques específiques. La definició de les regions biogeogràfiques ha estat sovint objecte de debat, especialment per a les regions florístiques, degut a la major capacitat de dispersió de les plantes en comparació amb els animals; essent les fronteres entre les regions florístiques més difuses que les de les regions zoogeogràfiques (Takhtajan, 1986; Lomolino *et al.*, 2010).

1.2. *Filogeografia*

La filogeografia es considera una subdisciplina de la biogeografia (Bowen, 1994; Avise, 2000) que analitza la distribució espacial de la diversitat genètica d'una espècie (o d'un complex d'espècies properes) amb l'objectiu de comprendre els processos i la història evolutiva subjacents a l'estructuració d'aquesta diversitat (Avise *et al.*, 1987). Com que l'estructura genètica de les poblacions està influïda per factors genètics i/o geogràfics, els estudis filogeogràfics permeten formular i comprovar hipòtesis sobre la distribució general de la diversitat i extreure conclusions sobre esdeveniments de colonització, diversificació i extinció de llinatges. La combinació de dades filogeogràfiques amb models de distribució d'espècies (*Species Distribution Model*, SDM) i dades del registre fòssil (Gavin *et al.*, 2014) pot ser particularment útil per esbrinar l'impacte de canvis climàtics passats en l'evolució de la biodiversitat.

Els estudis filogeogràfics poden ser adequats per identificar àrees amb una elevada concentració de diversitat genètica, i per tant, úniques i de gran prioritat per a la conservació de biodiversitat. El primer estudi que va proposar uns principis quantitius per orientar la planificació de la conservació a escala mundial fou el de Myers *et al.* (2000). En aquest estudi, es van identificar 25 regions prioritàries (*hotspots*, punts calents de biodiversitat) basant-se en dos criteris: 1) que l'àrea contingués almenys 1.500 espècies vegetals endèmiques; i 2) que l'àrea hagués perdut més del 70% de la seva vegetació original. Avui dia, el nombre de *hotspots* s'ha ampliat fins a 35 (Figura 2) en les últimes revisions de criteris per a la classificació de *hotspots* (Mittermeier, 2004; Williams *et al.*, 2011). La conservació de la biodiversitat en aquestes àrees és d'elevadíssima prioritat, ja que la seva pèrdua afectaria gairebé la meitat de totes les espècies de la Terra (Mittermeier *et al.*, 2011; Manafzadeh *et al.*, 2016). Tot i les rellevants aportacions per delimitar les àrees d'especial interès per la conservació, el concepte de *hotspot* està focalitzat en el nivell d'espècie, sense tenir en compte la diversitat genètica en el si d'una mateixa espècie. La variació genètica a nivell intraespecífic és la font principal del canvi evolutiu i és fonamental per mantenir l'habilitat de les espècies d'adaptar-se a canvis ambientals (Frankham *et al.*, 2002).

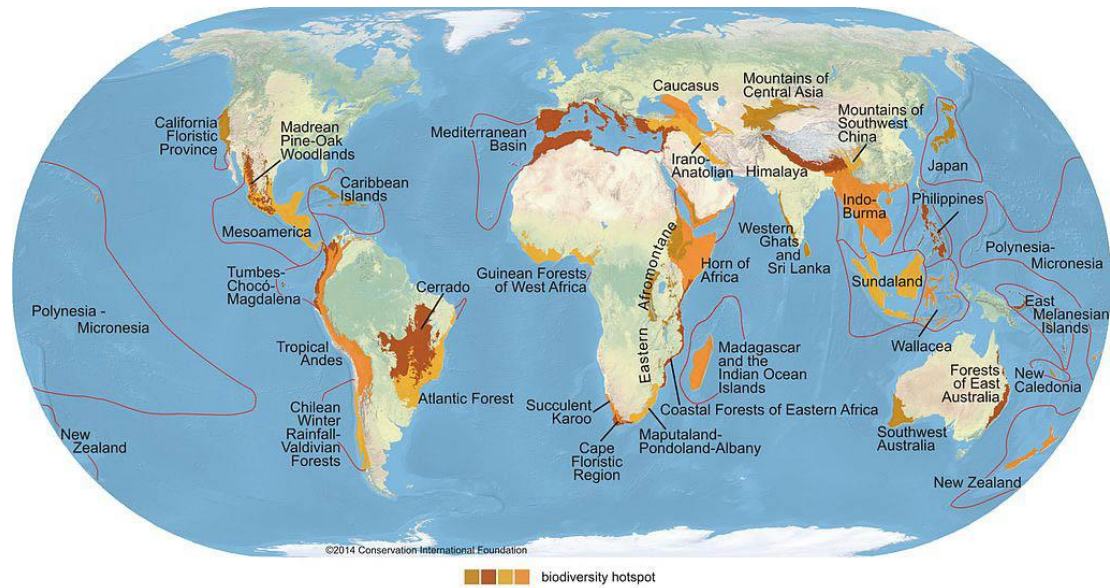


Figura 2. Delimitació dels 35 *hotspots* de biodiversitat — regions extraordinàries que alberguen grans quantitats d'espècies endèmiques (Mittermeier *et al.*, 2004). Tots els *hotspots* estan greument amenaçats per la pèrdua i degradació d'hàbitat, fent de la seva conservació un fet crucial per a la protecció de la natura i el benefici de la vida a la Terra. (Font: <http://commons.wikimedia.org>).

Els refugis filogeogràfics són àrees en les quals s'ha preservat la diversitat genètica de diferents llinatges, malgrat haver-se produït canvis climàtics adversos a nivell regional en el passat (Gavin *et al.*, 2014). Aquestes localitats han jugat (i encara juguen) un paper important com a reservoris i com a fonts de diversitat genètica (Stebbins, 1974). La riquesa d'espècies i endemismes en aquestes regions s'ha explicat en termes d'estabilitat climàtica local (Médail i Diadema, 2009). La presència d'aquests refugis hauria estat clau per al manteniment de la diversitat durant períodes climàtics poc favorables. La identificació precisa d'aquests refugis és vital per entendre l'evolució i aparició de les distribucions actuals de les espècies, i és una informació molt útil per dissenyar estratègies de conservació de diversitat òptimes tant per a espècies com per a poblacions (Médail i Diadema, 2009).

2. Àfrica

2.1. *Biomes africans*

La flora d'Àfrica es caracteritza per una gran diversitat i singularitat, com evidencien alguns estudis botànics i fitogeogràfics (Monod, 1971; Quézel, 1978; Dobignard i Chatelain, 2010) i per la presència de varis *hotspots* regionals de diversitat (Médail i Quézel, 1997; Vela i Benhouhou, 2007) i refugis (Médail i Diadema, 2009). L'excepcional naturalesa d'aquesta flora està probablement lligada a factors paleogeogràfics, geològics i climàtics que han originat un mosaic d'ecoregions i afavorit la diversificació de diversos llinatges (Quézel, 1978; Gehrke i Linder, 2014).

En el continent africà hi trobem grans contrastos en termes de diversitat vegetal: per exemple, la regió del Cap al sud d'Àfrica presenta una de les flors més riques en espècies endèmiques del món (Goldblatt, 1978; Goldblatt i Manning, 2002; Linder, 2003); mentre que el Sàhara, el desert càlid més extens del món, és una regió molt pobra en espècies (Burgess *et al.*, 2004). Les selves equatorials africanes són anormalment pobres en espècies si les comparem amb altres selves tropicals (Richards, 1973; Hamilton, 1976); en canvi, els boscos afromontans que trobem a la franja tropical són molt rics en espècies (Burgess *et al.*, 2007; Cordeiro *et al.*, 2007). Aquests boscos presenten biotes semblants malgrat trobar-se en muntanyes separades entre si per extenses regions de zones baixes (Schmitt *et al.*, 2010). Al sud, prop de la regió del Cap, es troba el desert de Namib, una de les zones més àrides del món, amb una flora i fauna particularment adaptades a ambients hiperàrids (Seely i Louw, 1980).

Una de les flors africanes més riques en espècies i endemismes és la flora austro-temperada africana (*African Austro-temperate Flora, AAF*) (Goldblatt, 1978; Cowling i Hilton-Taylor, 1997; Linder, 2014). L'AAF inclou les flors de la regió del Cap, de les muntanyes de Natal-Drakensberg al sud-est d'Àfrica i dels deserts del Namib-Karoo, essent aquesta última extremadament diversa en espècies resistents a l'aridesa. Alguns estudis postulen que l'elevada diversitat de l'AAF estaria vinculada a radiacions recents de certs grups, però també a la resiliència de

llinatges antics, apuntant així doncs a un patró evolutiu complex (Linder, 2005; Verboom *et al.*, 2009).

2.2. Història climàtica i geològica d'Àfrica

L'evolució de la biodiversitat a Àfrica ha estat influïda per canvis climàtics passats. Durant el mesozoic tardà, Àfrica formava part del supercontinent Gondwana, a l'hemisferi sud, i va gaudir d'un clima relativament humit i temperat (Raven i Axelrod, 1974). Després de separar-se d'Amèrica del Sud fa uns 95 Ma, Àfrica va desplaçar-se cap al nord, cap a la zona equatorial. El resultat va ser una tendència general cap a l'aridesa (Senut *et al.*, 2009). L'època del paleocè (56–66 Ma) va ser principalment humida i càlida, la qual cosa va afavorir probablement una diversificació important a la flora d'Àfrica occidental (Plana, 2004). Un augment global de les temperatures a l'eocè (33,9–56 Ma) va anar associat a un increment de l'aridesa a Àfrica central. Més endavant, entre l'eocè i l'oligocè (23–33,9 Ma), un esdeveniment de refredament global va conduir de nou a l'aridesa i l'extinció de moltes espècies, però no va canviar en gran mesura la composició de biomes (Axelrod i Raven, 1978). El miocè primerenc (16–23 Ma) va ser càlid i humit, amb una àmplia extensió de les selves tropicals, des del nord de l'actual Sàhara fins a zones del sud d'Àfrica. Seguidament, el miocè mitjà (11,6–16 Ma) va ser un període de grans canvis en el clima i la topografia. Una combinació de factors, com l'elevació gradual d'Àfrica oriental i el tancament successiu del mar de Tetis al nord (Trauth *et al.*, 2009), van conduir de nou a una intensificació de l'aridesa, però sense ser homogènia a tot el continent. La desertificació es va iniciar al sud-oest (al desert de Namib) fa uns 16–17 Ma, i es va estendre cap a l'est i cap al nord. Al sud d'Àfrica, la vegetació tropical i subtropical va ser reemplaçada per la sabana boscosa (Senut *et al.*, 2009). Les primeres evidències de forta aridesa a la regió del Sàhara daten de c. 6–7 Ma, al miocè tardà (Senut *et al.*, 2009). Les oscil·lacions climàtiques abruptes del final del pliocè i del plistocè varen causar forts cicles de contracció i expansió en la distribució d'espècies i van induir processos de diferenciació de les seves poblacions per dispersió i aïllament posterior o per vicariança (Migliore *et al.*, 2012). Els episodis climàtics

desfavorables probablement van reduir les àmplies àrees de distribució de moltes espècies de plantes i les van restringir a refugis climàtics situats al nord i sud d'Àfrica, però també en les anomenades "illes del cel" (*sky islands*) del Sàhara central (muntanyes del Hoggar, Tassilis i massissos del Tibesti), les muntanyes de l'est d'Àfrica, les penínsules del sud de la Mediterrània i la Macaronèsia (Quézel, 1978; Médail i Diadema, 2009; Migliore *et al.*, 2013).

2.3. La Rand Flora

Àfrica presenta un patró biogeogràfic particularment intrigant: hi ha nombrosos grups de plantes en els quals espècies evolutivament properes es troben separades per milers de kilòmetres (Winter, 1971; Thulin, 1994; Jürgens, 1997). Aquest és el cas de la *Rand Flora* (RF), en la qual trobem espècies d'un mateix gènere en regions molt allunyades entre si, situades als marges continentals d'Àfrica: la Macaronèsia, el nord-oest d'Àfrica, les muntanyes d'Àfrica occidental, la banya d'Àfrica i el sud d'Aràbia (incloent l'illa de Socotra), l'est d'Àfrica (incloent Madagascar.) i el sud d'Àfrica (Christ, 1892; Quézel, 1978; Andrus *et al.*, 2004, Sanmartín *et al.*, 2010). Tots els llinatges de la RF comparteixen una distribució en regions subhúmedes amb afinitats xeròfiles, de manera que tant les terres baixes tropicals d'Àfrica central com els deserts del Sàhara i àrabs al nord i els deserts de Namib i Kalahari al sud constitueixen *a priori* barreres climàtiques efectives a la seva dispersió.

Les explicacions històriques per aquest patró intracontinental han evolucionat al llarg d'aquests dos últims segles. Aquestes es poden resumir en dues hipòtesis principals: la hipòtesi de la vicariança i la hipòtesi de la dispersió.

1) Hipòtesi de la vicariança: les espècies actuals serien les romanents d'una antiga flora present a gairebé tot el continent que s'hauria expandit durant el cenozoic per tota Àfrica, la Macaronèsia i algunes regions de la Mediterrània. Posteriorment, moltes d'aquestes espècies s'haurien extingit en gran part d'aquestes àrees degut a condicions d'aridesa promovent l'aïllament de les poblacions i deixant flores relictas en àrees com la Macaronèsia, el nord-oest d'Àfrica i Aràbia, la regió del Cap

i els boscos afromontans d'Àfrica oriental i occidental (Axelrod i Raven, 1978; Quézel, 1978; Andrus *et al.*, 2004; Thiv *et al.*, 2011). Aquesta hipòtesi va ser durant molt temps la més recolzada pels biogeògrafs.

2) Hipòtesi de la dispersió: la distribució actual de la *Rand Flora* seria el resultat d'esdeveniments de dispersió relativament recents (posteriors a l'aridificació del Sàhara) entre regions aïllades geogràficament. Diversos estudis biogeogràfics recents (Fiz *et al.*, 2008; Sanmartín *et al.*, 2008; Pelsler *et al.*, 2012; Meseguer *et al.*, 2013) recolzen la dispersió a llarga distància com un procés determinant en la formació de disjuncions geogràfiques. La colonització de noves àrees geogràfiques sense competidors hauria afavorit una ràpida diversificació. Això podria explicar la gran riquesa florística de moltes d'aquestes regions.

S'han descrit dues rutes migratòries principals per explicar la distribució d'aquesta flora. La primera ruta implica dispersions cap al sud des de la regió mediterrània o Àsia central, colonitzant així l'est i el sud d'Àfrica; i la segona descriu dispersions cap al nord amb l'origen de dispersió a la regió del Cap i les muntanyes del sud-est d'Àfrica, i arribant al nord d'Àfrica, la Mediterrània i la Macaronèsia (Andrus *et al.*, 2004). Les muntanyes del Drakensberg al sud i les muntanyes de l'est d'Àfrica podrien haver actuat com a corredors que facilitarien la dispersió cap al nord de llinatges endèmics de la flora del Cap. La dispersió a través d'àrees intermèdies que actuen com a "passeres" (*stepping stones*) també podria haver estat possible. Les aïllades cadenes muntanyoses del Sàhara, com els massissos de Tibesti i de Hoggar, haurien permès dispersions a curta o mitja distància en *Campanula* (Alarcón *et al.*, 2013) actuant com a illes continentals amb hàbitats favorables.

L'elevat grau de diversitat d'espècies en les regions on trobem la *Rand Flora* podria explicar-se pel fet d'haver estat refugis climàtics. En aquestes àrees, l'estabilitat ambiental hauria permès a les espècies sobreviure, diversificar-se, i allora dispersar a zones adjacents en períodes en els que les condicions climàtiques eren favorables. En animals també s'ha detectat aquest tipus de patró biogeogràfic i s'han proposat diverses rutes que haurien connectat refugis africans en el passat (Kirk-Spriggs i McGregor, 2009; Brito *et al.*, 2014; Husemann *et al.*,

2014). Moltes distribucions de plantes al nord i sud d'Àfrica semblen ser la conseqüència de l'aïllament de llinatges en illes, refugis en zones de costa o en massissos muntanyencs connectats per corredors de migració. L'aïllament d'aquests refugis en determinats períodes podria haver donat peu a processos d'especiació al·lopàtrica. Les zones que alberguen majors índexs d'endemisme, a més d'haver estat refugis de diversitat, poden haver constituït fonts de colonització per alguns llinatges (Nicolas *et al.*, 2011; Husemann *et al.*, 2014). En resum, és possible que la *Rand Flora* sigui el resultat d'una combinació de processos de dispersió, vicariança i extinció repetits en diferents èpoques geològiques.

Un altre patró biogeogràfic destacat d'Àfrica és el corredor àrid africà (*African Arid Corridor, AAC*; Verdcourt, 1969), el qual s'ha relacionat sovint amb la *Rand Flora* (Pokorny *et al.*, 2015). L'AAC és un cinturó àrid que podria haver connectat les regions àrides del nord-est i del sud-oest del continent durant períodes climàtics secs. Estudis recents mostren que aquestes migracions datarien de fins fa 19 Ma (Schrire *et al.*, 2009; Thiv *et al.*, 2011). El registre fòssil juntament amb les dades moleculars obtingudes recolzen el rol de l'AAC com a ruta per a mamífers (Matthee i Robinson, 1997; Herron *et al.*, 2005) i plantes (Winter, 1971; Thulin, 1994; Jürgens, 1997; Schrire *et al.*, 2009) adaptades a ambients àrids. Les migracions a través de l'ACC haurien començat amb la progressiva aridificació d'Àfrica del sud al miocè i aquesta regió va actuar com a font de diversitat per a clades que van dispersar cap al nord d'Àfrica.

2.4. Afinitats biogeogràfiques entre Àfrica i la Macaronèsia

La Macaronèsia comprèn cinc arxipèlags atlàntics, tots ells d'origen volcànic (Açores, Cap Verd, illes Canàries, illes Selvages i Madeira), i dues localitats a les costes de Portugal i Marroc. Aquesta regió és particularment interessant per la seva singular flora i les afinitats biogeogràfiques que presenta amb algunes regions d'Àfrica. L'illa macaronèsica més antiga és la Selvagem Grande de les illes Selvages (27 Ma; Geldmacher *et al.*, 2001), mentre que la més recent és El Hierro, a l'arxipèlag de les illes Canàries (1,77 Ma; Carracedo *et al.*, 2002). El clima

macaronèsic oscil·la entre el subtropical humit (als arxipèlags situats al nord: Açores, Madeira) i el tropical suau (Cap Verd), i està fortament caracteritzat per la presència de vents alisis, els quals són humits i condicionen la distribució de les espècies vegetals.

La flora de la Macaronèsia presenta tres components principals: i) arbres i falgueres típics de la laurisilva, originaris del mar de Tetis, els quals haurien sobreviscut als períodes glacials del pliocè-pleistocè; ii) espècies que s'haurien originat en les pròpies illes, a partir d'ancestres procedents d'Àfrica i la conca mediterrània; i iii) espècies típicament mediterrànies (Fernández-Palacios *et al.*, 2011). Estudis previs indiquen que certs llinatges de la flora macaronèsica van diversificar-se *in situ* després d'un sol esdeveniment de colonització (Francisco-Ortega *et al.*, 1997, 2001; Allan *et al.*, 2004), mentre que en d'altres s'haurien produït múltiples processos de dispersió (Hess *et al.*, 2000; Percy i Cronk, 2002). Un estudi recent assenyala que és probable que uns pocs processos de colonització originessin la majoria d'endemismes macaronèsics (Fernández-Palacios *et al.*, 2011). Les característiques úniques de la flora macaronèsica són probablement el resultat de la combinació de factors tals com el grau d'aïllament geogràfic de les illes respecte al continent (Fernández-Palacios *et al.*, 2011), la major estabilitat climàtica de les illes respecte al continent en períodes de canvis climàtics importants (Vargas, 2007), així com les esclavissades volcàniques que podrien haver causat extincions locals i incrementat l'aïllament geogràfic de certes poblacions, afavorint l'aparició de noves espècies per al·lopatría (De Nascimento *et al.*, 2009).

3. Objecte d'estudi: campanulàcies i geraniàcies

L'objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral són dues famílies d'angiospermes amb una important presència en la conca mediterrània i el nord i sud d'Àfrica: i) les campanulàcies *s. str.*, que comprenen 50 gèneres i més de 1.000 espècies; i ii) les geraniàcies, les quals presenten més de 800 espècies distribuïdes en cinc gèneres. Les campanulàcies es van originar a Àsia, en les muntanyes de l'Himàlaia,

mentre que les geraniàcies tenen el seu origen al sud d'Àfrica, però ambdues famílies s'han diversificat de manera important en la regió mediterrània (Figura 3; Fiz *et al.*, 2008; Roquet *et al.*, 2008). L'origen de molts grups de plantes mediterrànies (incloent diversos llinatges d'aquestes dues famílies) sembla estar estretament lligat a la dispersió d'espècies ancestrals des d'Àsia i Àfrica en diferents èpoques (Axelrod, 1975; Verdú *et al.*, 2003).

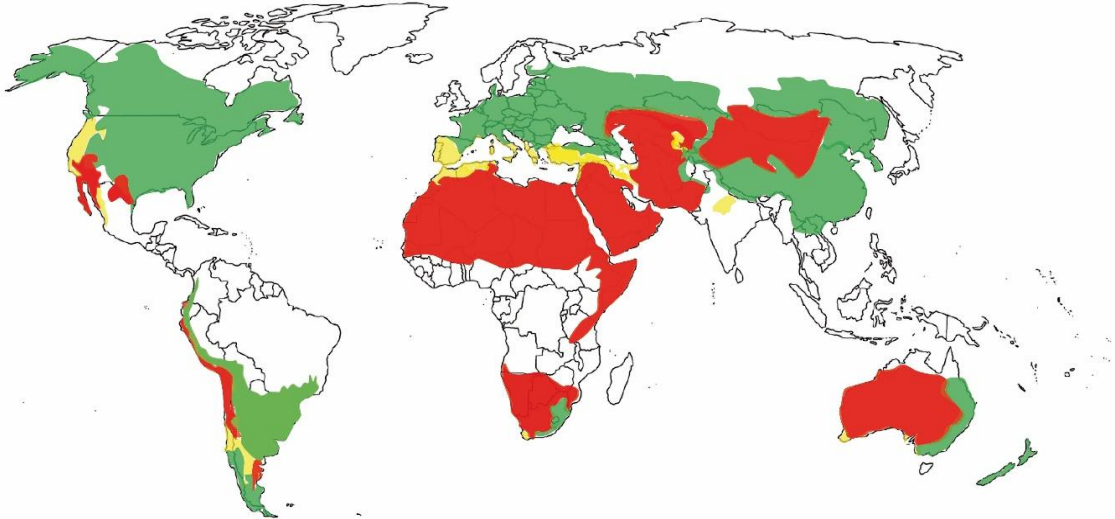


Figura 3. Mapa representatiu de les zones de clima no tropical basat en la classificació de Köppen-Geiger (versions de Trewartha, 1980; i Peel *et al.*, 2007). Aquest mapa mostra les àrees que habiten les espècies de campanulàcies i geraniàcies. Els colors representen els climes següents: vermell, desèrtic; groc, semidesèrtic; verd, humit temperat i fred.

Diversos estudis paleobotànics i moleculars associen els processos de diversificació de les plantes a la conca mediterrània principalment amb esdeveniments de canvis climàtics i geològics importants durant el neogen, com ara la crisi de salinitat del messinià (c. 5 Ma). La colonització del nord d'Àfrica (Mediterrània meridional) està relacionada amb l'aparició de les espècies mediterrànies i l'aparició d'estepes després de successius episodis de dessecació del Sàhara (c. 2,9 Ma; Médail i Diadema, 2009). En aquesta tesi, hem investigat a diferents escales espacials i temporals l'evolució i la història biogeogràfica de certs llinatges de *Campanula* (*Campanulaceae*) i *Monsonia* (*Geraniaceae*) distribuïts a diferents regions d'Àfrica, la Macaronèsia i la conca mediterrània, amb l'objectiu d'entendre millor les connexions biogeogràfiques entre aquestes regions, i la

influència relativa dels fenòmens climàtics i geològics del passat en la seva diversificació.

3.1. *La família Geraniaceae Jussieu*

La família *Geraniaceae* està formada per cinc gèneres: *California* Aldasoro *et al.*; *Erodium* L'Hér. ex Aiton; *Geranium* L.; *Monsonia* L. (el qual inclou les espècies de *Sarcocaulon* (DC.) Sweet); i *Pelargonium* L'Hér. ex Aiton (Figura 4). La majoria de les espècies pertanyen als gèneres *Geranium* (aproximadament 420 espècies; Aedo *et al.*, 1998) i *Pelargonium* (al voltant de 270 espècies; Stafford i Gibby, 1992). El gènere *Hypseocharis* Remy és el llinatge germà de les geraniàcies (Price i Palmer, 1993; Palazessi *et al.*, 2012). Hi ha hagut certa controvèrsia sobre la circumscripció taxonòmica d'*Hypseocharis*. Alguns autors consideren que aquest grup ha de ser inclòs dins de la família *Geraniaceae* (Price i Palmer 1993; Bakker *et al.*, 1998), mentre que estudis més recents (Palazessi *et al.*, 2012; Sytsma *et al.*, 2014) consideren que *Hypseocharis* pertany a una altra família (*Hypseocharitaceae* Sweet). En el nostre treball seguirem aquesta última classificació.

La majoria d'espècies de geraniàcies (92%) són perennes. El gènere que presenta més espècies anuals és *Erodium*, seguit de *Monsonia*, *Geranium* i *Pelargonium*. L'única espècie del gènere *California* (*California macrophylla* Aldasoro *et al.*) és anual. Les flors de *Monsonia*, *Geranium*, *Erodium* i *California* són més o menys actinomorfes, mentre que les de *Pelargonium* són zigomorfes. La majoria de geraniàcies són al·lògames exceptuant el gènere monoespecífic *California* que és autògam. El segon gènere que presenta més autogàmia és *Erodium*, mentre que en els altres gèneres és poc freqüent. Existeixen espècies amb flors unisexuals únicament a *Erodium* i *Geranium*. El primer gènere presenta 10 espècies dioiques o subdioiques, mentre que en el segon hi ha un nombre indeterminat d'aquestes espècies (Fiz *et al.*, 2006, 2008).

Les geraniàcies es distribueixen principalment en zones temperades. *Geranium* presenta una distribució força cosmopolita amb un centre de diversitat a la conca mediterrània; en canvi, la majoria d'espècies de *Pelargonium* es troben al

sud d'Àfrica, concretament a la regió del Cap. El tercer gènere amb més espècies és *Erodium* (74 espècies; Fiz *et al.*, 2006) i es distribueix principalment per la conca mediterrània. El gènere *Monsonia* (39 espècies; Moffett, 1979; Venter, 1979) té una distribució quasi exclusivament africana. El gènere monoespecífic *California* (Aldasoro *et al.*, 2002) viu exclusivament en zones àrides submediterrànies de l'oest d'Amèrica del Nord.

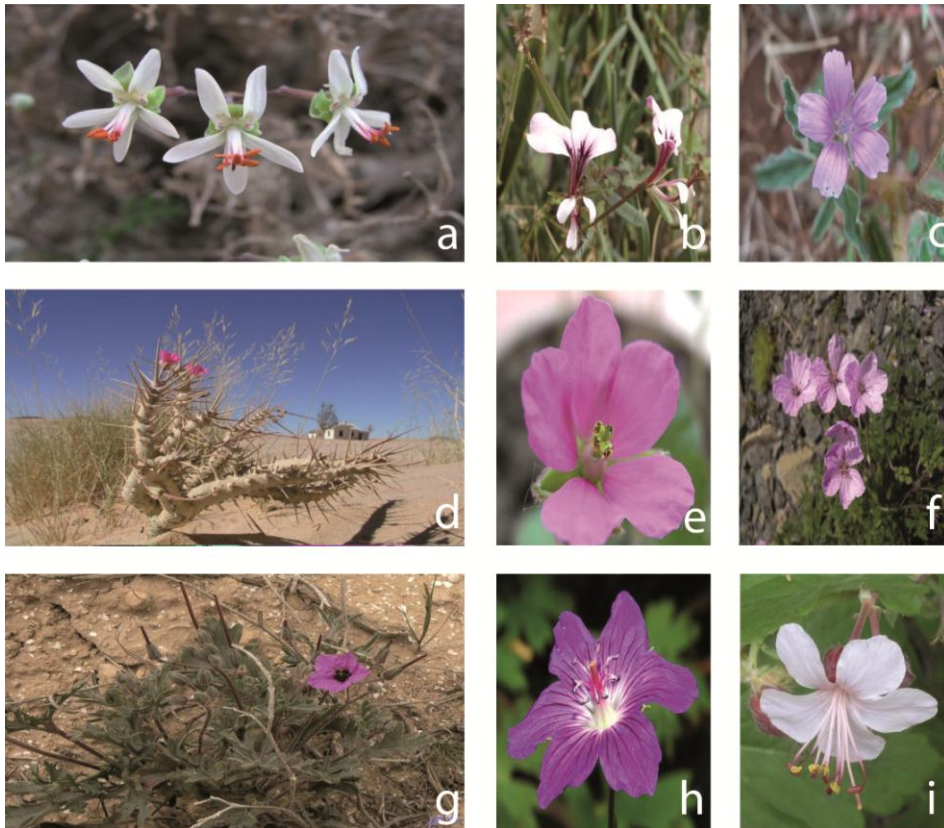


Figura 4. Representants dels cinc gèneres de geraniàcies. a) *Pelargonium dasyphyllum* E. Mey. ex Knuth, b) *Pelargonium tetragonum* L'Hér., c) *Monsonia angustifolia* E. Mey. ex A. Rich., d) *Monsonia patersonii* DC., e) *California macrophylla* (Hook. & Arn.) Aldasoro *et al.*, f) *Erodium absinthoides* Willd., g) *Erodium crassifolium* L'Hér. ex Aiton, h) *Geranium wlassovianum* Fisch. ex Link, i) *Geranium macrorrhizum* L. (Imatges: M. Alarcón, J.J. Aldasoro, <http://commons.wikimedia.org>).

3.2. *Relacions filogenètiques de les geraniàcies*

Diversos estudis han investigat les relacions filogenètiques dels cinc gèneres que componen *Geraniaceae*: *Pelargonium* (Bakker *et al.*, 1998, 2000, 2005), *Monsonia* (Aldasoro *et al.*, 2001; Touloumenidou *et al.*, 2007), *Erodium* juntament amb *California* (Fiz *et al.*, 2006) i *Geranium* (Price i Palmer, 1993; Pax *et*

al., 1997). Els gèneres més àmpliament estudiats (en nombre de tàxons) amb dades moleculars són *Pelargonium*, *Erodium* i *California* (Bakker *et al.*, 2000; Fiz *et al.*, 2006, 2008), romanent *Geranium* (Fiz *et al.*, 2008) i *Monsonia* poc estudiats.

L'arbre filogenètic realitzat per Price i Palmer (1993) amb seqüències de la regió cloroplàstica *rbcl* va revelar que *Pelargonium* és el gènere germà dels altres gèneres de geraniàcies. Aquest mateix estudi va concloure també que el gènere *Sarcocaulon* havia de ser inclòs dins de *Monsonia*. Aquesta estreta relació va ser corroborada per la informació proporcionada per l'intró *rpl2* (Price *et al.*, 1990; Downie i Palmer, 1992) i finalment es va incloure *Sarcocaulon* dins del gènere *Monsonia* (Albers, 1996; Albers i Löbbert, 1996). D'acord amb Price i Palmer (1993), *Erodium* i *Geranium*, els gèneres amb un origen més recent, són molt propers filogenèticament.

Posteriorment, s'han realitzat altres estudis que inclouen més seqüències amb l'objectiu d'obtenir filogènies amb major suport estadístic. Les anàlisis filogenètiques combinant seqüències de *trnL-F* i *rcbL* mostraren que el gènere *California* és germà de *Geranium* i *Erodium* (Fiz *et al.*, 2008). *California* presenta molts caràcters intermedis entre *Erodium*, *Geranium* i, fins i tot, algunes espècies de *Monsonia* (Aldasoro *et al.*, 2002; Fiz *et al.*, 2006). Tradicionalment, el gènere *California* s'havia inclòs dins d'*Erodium*, com a *Erodium macrophyllum*. Aldasoro *et al.* (2002) proposaren definir un gènere independent per a aquesta espècie basant-se en diversos caràcters morfològics clarament diferenciats (absència d'estaminodis, posició perpendicular de la fovèola del mericarpi, absència de pèls al mericarpi).

Els estudis evolutius realitzats fins ara indiquen que es va produir una diversificació significativa de les geraniàcies probablement durant el miocè mitjà a Àfrica, amb una important especiació de *Pelargonium*, i en menor grau, de *Monsonia*. Tot i això, la major diversificació de la família va tenir lloc durant el miocè tardà a la conca mediterrània en els gèneres *Geranium* i *Erodium* (Fiz *et al.*, 2008).

3.3. *Caràcters reproductius i pol·linització de les geraniàcies*

L'evolució de les diferents peces florals en les geraniàcies sembla estar relacionada amb les variacions en aflluència i pol·linitzadors durant la història d'aquesta família. El nèctar s'exhibeix en quatre tipus de nectaris a les geraniàcies:

- 1- Nectari format per un tub profund a l'hipant, present en la majoria d'espècies de *Pelargonium* (Vogel, 1998)
- 2- Nectari format per cinc tubs profunds a l'hipant, present en algunes espècies de *Monsonia* (Aldasoro *et al.*, 2001)
- 3- Nectari a la base dels estams, però amb el nèctar dins d'unes bosses tancades, típic d'algunes espècies de *Monsonia* (Aldasoro *et al.*, 2001)
- 4- Nectari extern que forma unes protuberàncies semiesfèriques, situades a la base de cada filament estaminal o a l'axil·la dels estams i els sèpals (Vogel, 1998; Aldasoro *et al.*, 2001). Aquest tipus de nectari el trobem en la resta d'espècies de *Monsonia*, *California*, *Erodium* i *Geranium*

El nectari típic de *Pelargonium* es podria haver originat per la reducció del nombre de tubs profunds (de cinc a un), i podria tractar-se d'una adaptació a insectes amb llengües llargues (Vogel, 1998). De fet, les espècies que presenten nectaris profunds atrauen principalment mosques amb llengües llargues i papallones (Goldblatt *et al.*, 1995; Struck i Van der Walt, 1996; Struck, 1997; Manning i Goldblatt, 1997; Vogel, 1998; Goldblatt i Manning, 2006). A més, els nectaris profunds de *Pelargonium* i algunes espècies de *Monsonia* podrien tenir l'avantatge de protegir el nèctar de la dessecació en condicions àrides.

No es coneixen quins són els pol·linitzadors de *Monsonia*, però s'hipotetitza que les espècies amb nectaris en tub estarien pol·linitzades per insectes de llengua llarga. Les abelles i els petits dípters són possibles visitants comuns d'*Erodium* i *Geranium* (Blionis i Vokou, 2001).

L'androceu també és un caràcter variant en els diferents gèneres de la família, amb una tendència a la reducció: *Monsonia* presenta 15 estams, mentre

que *Geranium* en té 10, *Pelargonium* mostra 5–7 estams i un nombre variable d'estaminodis. *Erodium* presenta 5 estams i 5 estaminodis i *California* només 5 estams.

El fruit de les geraniàcies és un esquizocarp que, en madurar, es divideix en mericarpis, els quals presenten estructures que faciliten l'enterrament de la llavor o bé la dispersió del propi mericarpí. L'estratègia de dispersió varia segons el gènere i hàbitat de les espècies. Per exemple, la majoria de les espècies de *Monsonia*, *Pelargonium* i algunes d'*Erodium* són anemocores, mentre que *California*, la majoria d'espècies de *Geranium* i la resta d'espècies de *Monsonia* i *Pelargonium* poden ser zoocores o autocores. Els mericarpis es poden moure gràcies a les extensions i contraccions de les arestes. Les arestes es desenrotllen quan l'ambient és humit i es tornen a enrotllar quan les condicions són seques, fent que el mericarpí quedi enterrat al terra (Cobelli, 1892). Aquest sistema d'enterrament, anomenat tripanocarpia, permet a la planta protegir les seves llavors dels depredadors (Van Oudtshoorn i Van Rooyen, 1999).

3.4. *Distribució biogeogràfica de les geraniàcies*

Les geraniàcies estan distribuïdes per tot el món; els seus principals centres de diversitat es troben al sud d'Àfrica i a la conca mediterrània (Figura 5). Les espècies del gènere *Hypseocharis* són endèmiques de la serralada dels Andes, en altituds que oscil·len entre els 2000 i els 4200 *msnm*. Els gèneres *Pelargonium* i *Monsonia* estan principalment distribuïts a Àfrica i Aràbia (Figura 5; Hutchinson, 1969). La diferenciació d'espècies de *Pelargonium* respecte a *Monsonia* pot estar relacionada amb l'adaptació als ambients del desert i d'estepa, que es van convertir cada vegada més estesos en aquestes regions durant el final del neogen (Kers, 1968; Venter, 1983). La majoria d'espècies de *Pelargonium* es distribueixen a la província del Cap al sud d'Àfrica i la resta a l'est d'Àfrica, Austràlia, Madagascar i Tristan da Cunha (Figura 5; Bakker *et al.*, 1998, 2000, 2005). Les 39 espècies de *Monsonia* es troben a Àfrica i el sud-oest d'Àsia, però la major part de la diversitat del gènere es concentra al desert del Namib-Karoo, la regió del Cap i les muntanyes

del Drakensberg al sud-est d'Àfrica (Figura 5; Kers, 1968; Moffett, 1979; Venter, 1979; Verhoeven i Venter, 1986; Albers, 1996). Algunes espècies de *Monsonia* que habiten zones àrides presenten tiges carnosos amb espines. Aquesta peculiaritat morfològica va servir per separar el gènere *Sarcocaulon* de *Monsonia* en el passat, però actualment les espècies de *Sarcocaulon* s'inclouen en el gènere *Monsonia*, ja que les dades filogenètiques disponibles (Albers, 1996) indiquen clarament que *Sarcocaulon* es troba inserit en *Monsonia*.

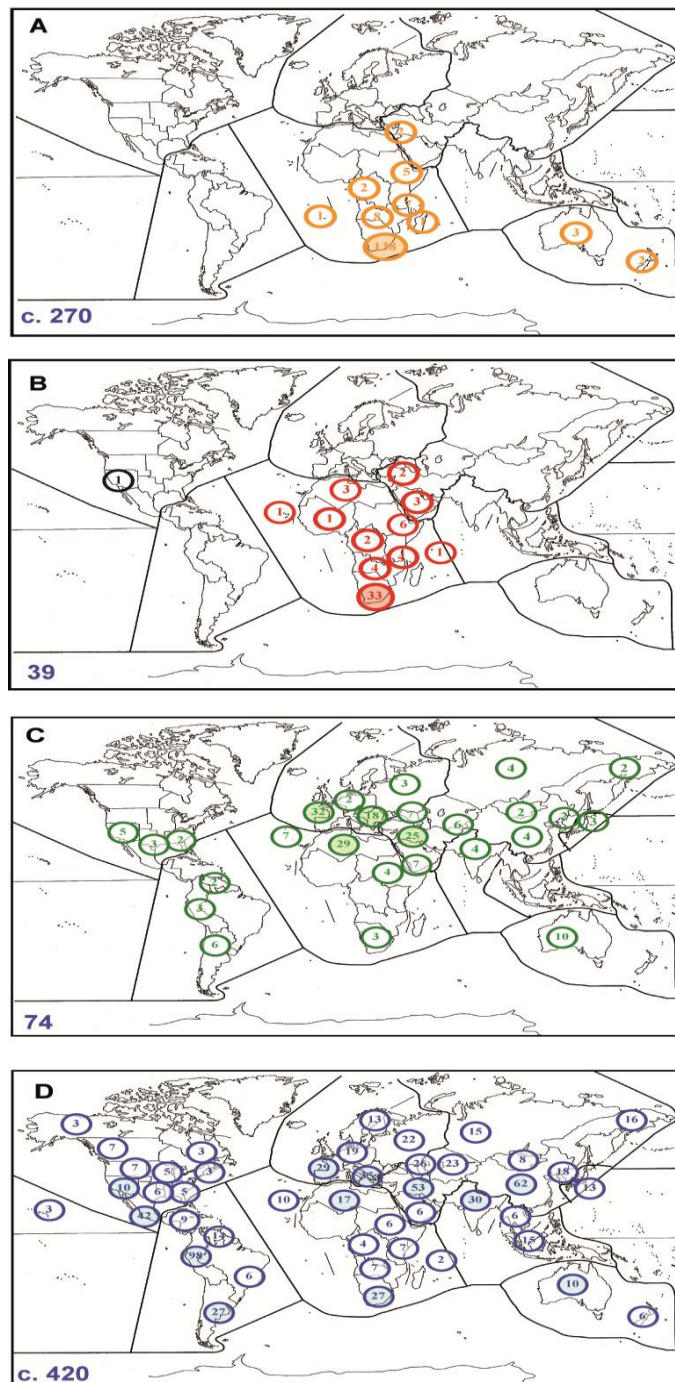


Figura 5. Mapamundis mostrant el nombre d'espècies de (A) *Pelargonium*, (B) *Monsonia* (verd) i *California* (negre), (C) *Erodium* i (D) *Geranium* en les regions biogeogràfiques delimitades per Takhtajan. Adaptat de la tesi doctoral d'Alarcón (2008).

Geranium i *Erodium* es troben més àmpliament distribuïts en els continents de l'hemisferi nord, sobretot a la regió mediterrània (Figura 5; Boesewinkel, 1988; Yeo, 1990). El gènere *California* és present a la zona submediterrània àrida de l'oest d'Amèrica del Nord (Aldasoro *et al.*, 2002). *Erodium* està representat a tots els continents excepte a l'Antàrtica, però el seu major centre de diversitat és a la regió mediterrània, on trobem 62 de les 74 espècies del gènere. Finalment, *Geranium*, el gènere més nombrós, està principalment distribuït per zones ruderals de climes temperats, però també en regions muntanyoses de tot el món (Figura 5; Yeo, 1990; Aedo, 1996, 2001, 2003; Aedo *et al.*, 1998, 2005; Aedo i de la Estrella, 2006).

4. La família *Campanulaceae* Jussieu

La família *Campanulaceae* Jussieu pertany a l'ordre *Asterales*, i està formada per cinc subfamílies: *Campanuloideae* Burnett; *Cyphioideae* A. DC. Walp.; *Cyphocarpoideae* Miers; *Lobelioideae* Schönland; *Nemacladoideae* Lammers; essent *Campanuloideae* i *Lobelioideae* les més nombroses en espècies i gèneres (Stevens, 2013). Aquesta família conté prop de 2.400 espècies distribuïdes en 84 gèneres de plantes herbàcies, arbustos i algun arbre petit (Figura 6).

La subfamília *Campanuloideae* (campanulàcies *sensu stricto*) són majoritàriament herbes perennes, i menys freqüentment anuals o biennals. Algunes espècies són lianes, arbustos o petits arbres, típicament terrestres i rarament aquàtiques o epífites, i habitualment amb làtex blanc. Les tiges poden ser simples o ramificades amb fulles alternes normalment simples, enteres o dentades. Les flors són habitualment hermafrodites, pentàmeres i actinomorfes; generalment situades a les axil·les de les fulles, rarament a l'àpex de la tija (Philipson, 1948; Carolin, 1967). Les corol·les solen ser tubulars o acampanades amb cinc lòbuls i de

color blavós, lila o blanc i menys freqüentment grogues o vermelloses. El tipus de fruit més comú és la càpsula dehiscent per valves o porus situats a l'apex de l'ovari i que conté nombroses llavors. En alguns gèneres la càpsula pot esdevenir una acolorida baia carnosa. Les campanulàcies *s. str.* tenen una distribució subcosmopolita, amb una major concentració d'espècies a l'hemisferi nord, tot i que al sud d'Àfrica hi ha també una gran diversitat d'espècies.

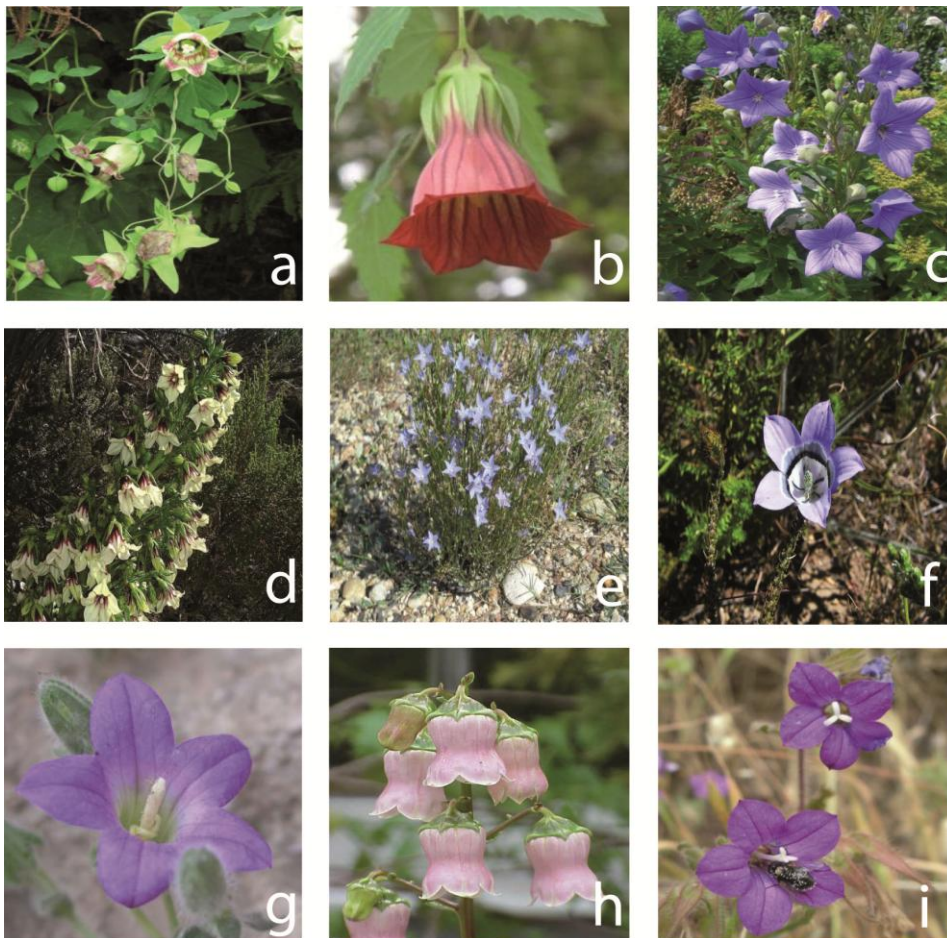


Figura 6. Representants de les tres tribus de campanulàcies. a) *Codonopsis lanceolata* (Siebold i Zucc.) Benth. i Hook.f. ex Trautv., b) *Canarina eminii* Asch. i Schweinf., c) *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A.DC., d) *Heterochaenia rivalsii* Badré i Cadet, e) *Wahlenbergia communis* Carolin, f) *Roella ciliata* L., g) *Campanula mollis* L., h) *Azorina vidalii* (H.C.Watson) Feer, i) *Campanula kremeri* Boiss. i Reut. (Imatges: M. Alarcón, J.J. Aldasoro, <http://commons.wikimedia.org>).

4.1. **Relacions filogenètiques de les campanulàcies s. str.**

La classificació taxonòmica de les campanulàcies s. str. ha estat controvertida. Schönland (1889) va definir tres subtribus basant-se en caràcters de l'ovari. Posteriorment, Yeo (1993) va actualitzar aquesta classificació definint tres tribus: *Campanuleae* Dumort., *Wahlenbergieae* Endl. i *Platycodoneae* Yeo. La tribu *Campanuleae* es diferencia de les altres dues perquè presenta ovari inferior i com fruit una càpsula dehiscent pels costats (rarament indehiscent), mentre que *Wahlenbergieae* té una càpsula que s'obre per la part apical. A les *Platycodoneae* els carpels s'alternen amb els sèpals. Seguint aquesta classificació, la tribu *Platycodoneae* és monofilètica, però Thulin (1975) va proposar que totes les espècies relacionades amb *Campanula* que presentessin pol·len colporat o colpat havien de ser incloses dins de *Platycodoneae*. Per tant, els gèneres *Campanumoea* Blume, *Canarina* L., *Codonopsis* Wall., *Cyanathus* Wall. ex Benth., *Leptocodon* Lem. i *Platycodon* A. DC. es consideren dins de *Platycodoneae*. Estudis moleculars basats en seqüències nuclears (ITS; Eddie *et al.*, 2003) i cloroplàstiques (*rbcl*; Cosner *et al.*, 2004) concorden amb aquesta classificació. Aquests estudis mostren que la tribu *Platycodoneae* és germana de les altres dues tribus, formant *Campanuleae* i *Wahlenbergieae* un clade amb suport estadístic (Cosner *et al.*, 2004).

En els últims anys s'han publicat diferents estudis per resoldre les relacions filogenètiques del gènere amb més espècies de la família, *Campanula*, i de gèneres propers (Eddie *et al.*, 2003; Cosner *et al.*, 2004; Roquet *et al.*, 2008). Aquestes publicacions mostren que la tribu *Campanuleae sensu* Yeo (1993) hauria d'incloure el gènere *Edraianthus* DC., el qual s'havia inclòs originalment a *Wahlenbergieae* (Schönland, 1889) sobre la base de la dehiscència irregular dels seus fruits.

4.2. **Caràcters reproductius i pol·linització de les campanulàcies s. str.**

Les campanulàcies presenten proteràndria combinada amb un mecanisme de presentació secundària del pol·len, el qual afavoreix la pol·linització encreuada. Aquest mecanisme consisteix en què el pol·len es presenta als pol·linitzadors no directament a les anteres, sinó en uns pèls col·lectors o enganxosos dels estils. El

pol·len s'allibera de les anteres quan l'estil s'allarga i així apareix com un cilindre al voltant de l'estil quan la flor s'obre (Erdelska, 1983; Leins i Erbar, 1990). La majoria de les espècies són pol·linitzades per animals que a l'entrar dins de la corol·la per obtenir el nèctar queden impregnats de grans de pol·len (Nowicke *et al.*, 1992). Molts visitants són insectes generalistes com abelles, vespes, mosques, papallones o arnes. Les espècies amb corol·les zigomorfe presenten pol·linitzadors més especialitzats i restringits. En algunes campanulàcies s'ha documentat també la pol·linització per vertebrats, majoritàriament en espècies endèmiques d'illes oceàniques (Olesen *et al.*, 2012).

4.3. Distribució i biogeografia de les campanulàcies

Les campanulàcies es distribueixen per tots els continents, excepte a l'Antàrtica, i a moltes illes oceàniques, tant tropicals com àrtiques (Figura 7). S'han proposat moltes hipòtesis sobre l'origen geogràfic d'aquesta família. Primer es va postular un origen a Lauràsia i Àfrica durant el paleogen (Raven i Axelrod, 1974); més tard, Hong (1995) va suggerir que el seu origen es trobaria a l'est d'Àsia, i que la regió mediterrània i el sud d'Àfrica constituïrien centres secundaris de diferenciació i diversificació. En canvi, altres autors consideren que l'origen podria haver estat a Gondwana degut a que diversos gèneres que es van diversificar en primer lloc a partir de l'ancestre de la família habiten l'hemisferi sud (Bremer i Gustaffsson, 1997) o a Àfrica basant-se en la distribució de *Lobelioideae* (Eddie i Cupido, 2001).

Tot i que a escala familiar les distribucions són molt àmplies, les subfamílies estan més restringides. Les tres subfamílies més petites habiten regions concretes de les quals es poden considerar endèmiques: *Cyphioideae* es troba al sud d'Àfrica, *Cyphocarpoideae* es distribueix per Xile i *Nemacladoideae* pel sud-oest d'Amèrica del Nord. Les dues subfamílies principals, *Campanuloideae* i *Lobelioideae*, tenen distribucions molt més àmplies, però en gran part no es solapen. En general, les espècies de *Campanuloideae* es troben en les zones temperades del paleàrtic, mentre que les *Lobelioideae* predominen en regions tropicals i subtropicals.

Aproximadament la meitat de les espècies de *Campanulaceae* es reparteixen per Àfrica i Amèrica del Sud. El 18% es troben a Àsia, l'11% a Europa, un altre 11% a Amèrica del Nord, un 6% a la Polinèsia i finalment un 4% a Australàsia. El major centre de diversitat de les campanulàcies és al sud d'Àfrica on es concentren 18 gèneres i prop de 400 espècies. Altres centres de diversitat importants són els Andes d'Amèrica del Sud, amb més de 500 espècies de *Lobelioideae* i Euràsia entre la Mediterrània i l'Himàlaia, on hi ha molts representants de *Campanuloideae*. Cal destacar també la presència de més de 130 endemismes de *Lobelioideae* en petites illes aïllades de Hawaii.

La major radiació de *Campanuloideae* en la regió paleàrtica hauria coincidit amb la col·lisió entre la península d'Aràbia i Euràsia en l'eocè tardà (c. 35 Ma; Crowl *et al.*, 2016). S'han documentat múltiples intercanvis i dispersions entre Àfrica i la regió paleàrtica als gèneres *Canarina*, *Wahlenbergia* i *Campanula* grup *Azorina* (Crowl *et al.*, 2016). S'ha plantejat la hipòtesi que *Campanula* i gèneres relacionats haurien evolucionat en la regió mediterrània, des d'on podrien haver-se dispersat cap a altres indrets de l'hemisferi nord durant les èpoques preglacials (Eddie *et al.*, 2003). Independentment de les diferents hipòtesis sobre l'origen geogràfic de *Campanula* i gèneres germans, la varietat de caràcters morfològics, hàbitats ecològics, sistemes reproductius i nombre de cromosomes apunten a una història d'alta i ràpida diversificació i un complex patró biogeogràfic (Roquet *et al.*, 2008).

En l'estudi de Roquet *et al.* (2009) es divideix el nucli de *Campanula* en tres grups (*Campanula s. str.*, *Rapunculus* i *Trachelium*); aquesta divergència s'hauria produït al miocè mitjà (13,7–14,7 Ma), coincidint amb el refredament global del planeta (Flower i Kennett, 1994). Els tres subclades s'haurien originat i evolucionat a l'est de la conca mediterrània al miocè tardà. Moltes de les espècies del subclade de *Campanula s. str.* es distribueixen per la costa est de la Mediterrània, però també al sud-oest d'Europa, la Macaronèsia o el nord-oest d'Àfrica (Roquet *et al.*, 2009).

Aquests patrons semblen indicar que les espècies de *Campanula s. str.* deriven d'un ancestre àmpliament distribuït pel nord d'Àfrica que, degut a les

fluctuacions climàtiques, hauria quedat aïllat en diferents regions africanes o àrees contigües, donant lloc a noves espècies. La complexa història biogeogràfica d'aquest grup de *Campanula s. str.* podria ser el resultat de diverses expansions de l'àrea de distribució d'aquestes espècies, seguides de períodes d'aïllament que haurien afavorit l'especiació en regions climàticament estables, així com esdeveniments de dispersió de llarga distància a la Macaronèsia i Amèrica del Nord. El grup de *Campanula s. str.* inclou un petit subclade –el grup *Azorina*– format per 20 espècies del continent africà i tres espècies distribuïdes per la Macaronèsia. L'ancestre comú més recent d'aquest grup data del miocè tardà (Olesen *et al.*, 2012). En aquest llinatge s'han documentat esdeveniments de dispersió a les Açores (*Azorina vidalii* H.C. Wats. Feer), a les illes Canàries (*Campanula occidentalis* Y. Nyman) i a l'arxipèlag de Cap Verd (*Campanula jacobaea* C. Sm. ex Webb) (Alarcón *et al.*, 2013).

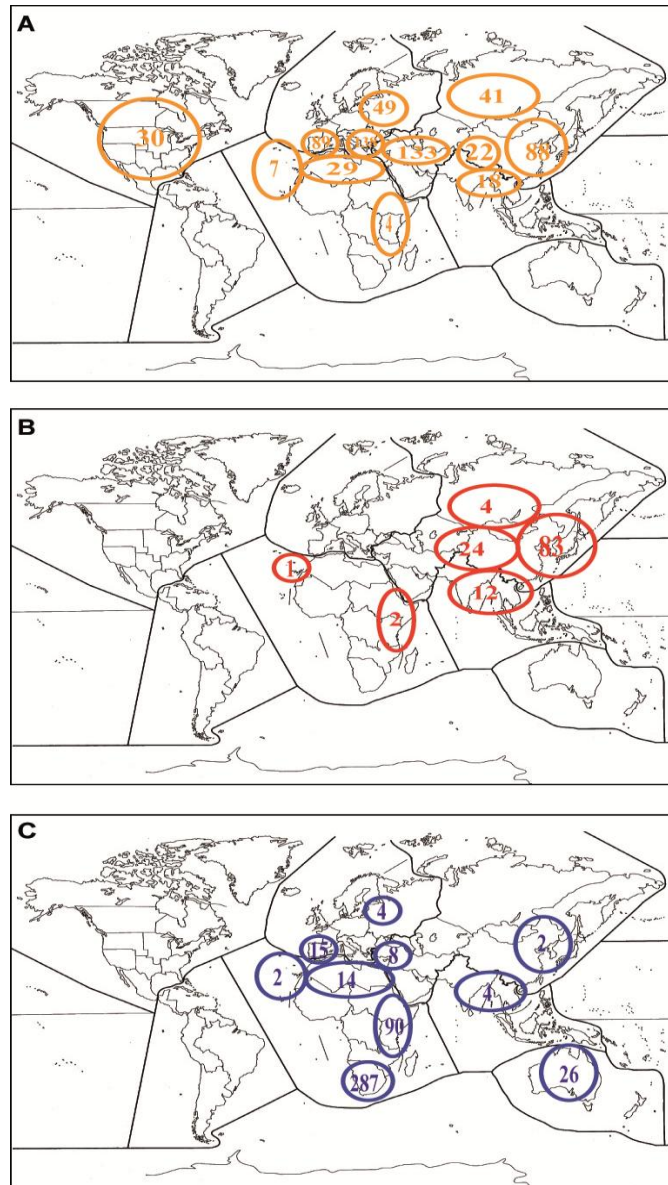


Figura 7. Mapamundis mostrant el nombre d'espècies de les tribus (A) *Campanuleae*, (B) *Platycodeae*, i (C) *Wahlenbergiae* en les regions biogeogràfiques delimitades per Takhtajan. Adaptat de Roquet *et al.* (2008).

Referències bibliogràfiques

Aedo, C. (1996) Revision of *Geranium* subgenus *Erodioidea* (Geraniaceae). *Systematic Botany Monographs*, **49**, 1–104.

Aedo, C. (2001) Taxonomic revision of *Geranium* sect. *Brasiliensia* (Geraniaceae). *Systematic Botany*, **26**, 205–215.

- Aedo, C. (2003) Taxonomic revision of *Geranium* sect. *Trygonium* (Geraniaceae). *Botaniczeskii Zhurnal*, **88**, 124–131.
- Aedo, C., de la Hoz, F. P. i Garmendia, F. M. (1998) World checklist of *Geranium* L. (Geraniaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **56**, 211–232.
- Aedo, C., Navarro, C. i Alarcón, M. L. (2005) Taxonomic revision of *Geranium* sections *Andina* and *Chilensia* (Geraniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **149**, 1–68.
- Aedo, C. i de La Estrella, M. (2006) Taxonomic revision of *Geranium* subsect. *Tuberosa* (Boiss.) Yeo (Geraniaceae). *Israel Journal of Plant Sciences*, **54**, 19–54.
- Alarcón, M. (2008) Biología reproductiva y evolución del género *Erodium* L'Hér. Ex Aiton. Consecuencias y comparación con otras Geraniaceae. *Universidad Rey Juan Carlos*, tesi doctoral.
- Alarcón, M., Roquet, C., García-Fernández, A., Vargas, P. i Aldasoro, J. J. (2013) Phylogenetic and phylogeographic evidence for a Pleistocene disjunction between *Campanula jacobaea* (Cape Verde Islands) and *C. balfourii* (Socotra). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, 828–836.
- Albers, F. (1996) The taxonomic status of *Sarcocaulon* (Geraniaceae). *South African Journal of Botany*, **62**, 345–347.
- Albers, F. i Löbbert, D. (1996) The status of the genus *Sarcocaulon* (Geraniaceae). *XXII SAAB Congress, Abstract 36*. Ciutat del Cap: University of Stellenbosch.
- Aldasoro, J. J., Navarro, C., Vargas, P. i Aedo, C. (2001) Anatomy, morphology, and cladistic analysis of *Monsonia* L. (Geraniaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **59**, 75–100.
- Aldasoro, J. J., Navarro, C., Vargas, P., Sáez, L. i Aedo, C. (2002) *California*, a new genus of Geraniaceae endemic to the southwest of North America. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **59**, 209–216.

- Allan, G. J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E. i Zimmer, E. A. (2004) Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**, 123–138.
- Andrus, N., Trusty, J., Santos-Guerra, A., Jansen, R. K. i Francisco-Ortega, J. (2004) Using molecular phylogenies to test phytogeographical links between East/South Africa-Southern Arabia and the Macaronesian islands—a review, and the case of *Vierea* and *Pulicaria* section *Vieraeopsis* (Asteraceae). *Taxon*, **53**, 333–346.
- Avise, J. C. *et al.* (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489–522.
- Avise, J. C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Axelrod, D. I. (1975) Evolution and biogeography of Madrean-Tethyan sclerophyll vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **62**, 280–334.
- Axelrod, D. I. i Raven, P. H. (1978) Late Cretaceous and Tertiary vegetation history of Africa. *Biogeography and Ecology of Southern Africa*, **31**, 77–130.
- Bakker, F. T., Vassiliades, D. D., Morton, C. i Savolainen, V. (1998) Phylogenetic relationships of *Biebersteinia* Stephan (Geraniaceae) inferred from *rbcl* and *atpB* sequence comparisons. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **127**, 149–158.
- Bakker, F. T., Culham, A., Pankhurst, C. E. i Gibby, M. (2000) Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany*, **87**, 727–734.
- Bakker, F. T., Culham, A., de Marais, A. B. i Gibby, M. (2005) Nested radiation in Cape *Pelargonium*. *Plant Species-level Systematics: New Perspectives on Pattern i Process*, **143**, 75–100.

- Blionis, G. J. i Vokou, D. (2001) Pollination ecology of *Campanula* species on Mt. Olympos, Greece. *Ecography*, **24**, 287–297.
- Boesewinkel, F. D. (1988) The seed structure and taxonomic relationships of *Hypseocharis* Remy. *Plant Biology*, **37**, 111–120.
- Bowen, B. W. *et al.* (1994) Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution*, **48**, 1820–1828.
- Bremer, K. i Gustafsson, M. H. (1997) East Gondwana ancestry of the sunflower alliance of families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 9188–9190.
- Brito, J. C. *et al.* (2014) Unravelling biodiversity, evolution and threats to conservation in the Sahara-Sahel. *Biological Reviews*, **89**, 215–231.
- Burgess, N. *et al.* (2004) *Terrestrial ecoregions of Africa and Madagascar: a conservation assessment*. Washington DC: Island Press.
- Burgess, N. D. *et al.* (2007) Correlations among species distributions, human density and human infrastructure across the high biodiversity tropical mountains of Africa. *Biological Conservation*, **134**, 164–177.
- Carolin, R. (1967) The concept of the inflorescence in the order Campanulales. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, **92**, 7–26.
- Carracedo, J. C. *et al.* (2002) Cenozoic volcanism II: the Canary Islands. In W. Gibbons i T. Moreno (Eds.), *The geology of Spain* (pp 439–472). Londres: The Geological Society.
- Christ, H. (1892) Exposé sur le rôle que joue dans le domaine de nos flores la flore dite ancienne africaine. *Archives des Sciences Physiques et Naturelles Genève*, **3**, 369–374.
- Cobelli, T. (1892) I Movimenti del fiore e del frutto dell'*Erodium gruinum*. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, **24**, 59–64.

- Cordeiro, N. J. *et al.* (2007) Conservation in areas of high population density in sub-Saharan Africa. *Biological Conservation*, **134**, 155–163.
- Cosner, M. E., Raubeson, L. A. i Jansen, R. K. (2004) Chloroplast DNA rearrangements in Campanulaceae: phylogenetic utility of highly rearranged genomes. *BMC Evolutionary Biology*, **4**, 27.
- Cowling, R. M. i Hilton-Taylor, C. (1997) Phytogeography, flora and endemism. In R.M. Cowling, D.M. Richardson i S.M. Pierce (Eds.), *Vegetation of southern Africa* (pp. 43–61). Cambridge: Cambridge University Press.
- Crowl, A. A. *et al.* (2016) A global perspective on Campanulaceae: Biogeographic, genomic, and floral evolution. *American Journal of Botany*, **103**, 233–245.
- Dobignard, A. i Chatelain, C. (2010) *An index of synonyms for the flora of North Africa: Volume 1: Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledoneae*. Ginebra: Éditions des Conservatoire et Jardin Botaniques.
- Downie, S. R. i Palmer, J. D. (1992) Use of chloroplast DNA rpl2 intron in dicotyledons: molecular and phylogenetic implications. *Evolution*, **45**, 1245–1259.
- Eddie, W. M. i Cupido, C. N. (2001) Some observations on the reproductive morphology of the Wahlenbergioid genera of the family Campanulaceae s. str. from the fynbos vegetation of South Africa. *Botanical Society of America. Abstracts*, **111**.
- Eddie, W. M. M., Shulkina, T., Gaskin, J., Haberle, R. C. i Jansen, R. K. (2003) Phylogeny of Campanulaceae s. str. inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **90**, 554–575.
- Erdelska, O. (1983) Dichogamy and pistil hairs in the Campanulaceae. *Preslia*, **55**, 269–271.
- Fernández-Palacios, J. M. *et al.* (2011) A reconstruction of Palaeo-Macaronesia, with particular reference to the long-term biogeography of the Atlantic island laurel forests. *Journal of Biogeography*, **38**, 226–246.

- Fiz, O., Vargas, P., Alarcón, M. L. i Aldasoro, J. J. (2006) Phylogenetic relationships and evolution in *Erodium* (Geraniaceae) based on trnL-trnF sequences. *Systematic Botany*, **31**, 739–763.
- Fiz, O. *et al.* (2008) Phylogeny and historical biogeography of Geraniaceae in relation to climate changes and pollination ecology. *Systematic Botany*, **33**, 326–342.
- Flower, B. P. i Kennett, J. P. (1994) The middle Miocene climatic transition: East Antarctic ice sheet development, deep ocean circulation and global carbon cycling. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **108**, 537–555.
- Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Hines, A. i Jansen, R. (1997) Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1595–1595.
- Francisco-Ortega, J., Barber, J. C., Santos-Guerra, A., Febles-Hernández, R. i Jansen, R. K. (2001) Origin and evolution of the endemic genera of *Gonosperminae* (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, **88**, 161–169.
- Frankham, R., Briscoe, D. A. i Ballou, J. D. (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gavin, D. G. *et al.* (2014) Climate refugia: joint inference from fossil records, species distribution models and phylogeography. *New Phytologist*, **204**, 37–54.
- Geeta, R. *et al.* (2014) Biodiversity only makes sense in the light of evolution. *Journal of Biosciences*, **39**, 333.
- Gehrke, B. i Linder, H. P. (2014) Species richness, endemism and species composition in the tropical Afroalpine flora. *Alpine Botany*, **124**, 165–177.
- Geldmacher, J., Hoernle, K., van den Bogaard, P., Zankl, G. i Garbe-Schönberg, D. (2001) Earlier history of the ≥ 70 -Ma-old Canary hotspot based on the temporal and geochemical evolution of the Selvagen Archipelago and

- neighboring seamounts in the eastern North Atlantic. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **111**, 55–87.
- Goldblatt, P. (1978) An analysis of the flora of southern Africa: its characteristics, relationships, and origins. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **65**, 369–436.
- Goldblatt, P., Manning, J. C. i Bernhardt, P. (1995) Pollination biology of *Lapeirousia* subgenus *Lapeirousia* (Iridaceae) in Southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**, 517–534.
- Goldblatt, P. i Manning, J. C. (2002) Plant diversity of the Cape region of southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **89**, 281–302.
- Goldblatt, P. i Manning, J. C. (2006) Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany*, **97**, 317–344.
- Hamilton, A. C. (1976) The significance of patterns of distribution shown by forest plants and animals in tropical Africa for the reconstruction of upper Pleistocene palaeoenvironments: a review. *Palaeoecology of Africa*, **9**, 63–97.
- Herron, M. D., Waterman, J. M. i Parkinson, C. L. (2005) Phylogeny and historical biogeography of African ground squirrels: the role of climate change in the evolution of *Xerus*. *Molecular Ecology*, **14**, 2773–2788.
- Hess, J., Kadereit, J. W. i Vargas, P. (2000) The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Molecular Ecology*, **9**, 857–868.
- Hodkinson, I. D. (2005) Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews*, **80**, 489–513.
- Hong, D. (1995) The geography of the Campanulaceae: on the distribution centres. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, **33**, 521–536.

- Husemann, M., Schmitt, T., Zachos, F. E., Ulrich, W. i Habel, J. C. (2014) Palaeartic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaeartic biota. *Journal of Biogeography*, **41**, 81–94.
- Hutchinson, J. (1969) *Evolution and phylogeny of flowering plants*. Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
- Jürgens, N. (1997) Floristic biodiversity and history of African arid regions. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 495–514.
- Kers, L. E. (1968) Contributions towards a revision of *Monsonia* (Geraniaceae). *Botaniska Notiser*, **121**, 44.
- Kirk-Spriggs, A. H. i McGregor, G. (2009) Disjunctions in the *Diptera* (Insecta) fauna of the Mediterranean Province and southern Africa and a discussion of biogeographical considerations: ecological overview article. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, **64**, 32–52.
- Kreft, H. i Jetz, W. (2010) A framework for delineating biogeographical regions based on species distributions. *Journal of Biogeography*, **37**, 2029–2053.
- Leins, P. i Erbar, C. (1990) On the mechanisms of secondary pollen presentation in the Campanulales-Asterales-complex. *Plant Biology*, **103**, 87–92.
- Linder, H. P. (2003) The radiation of the Cape flora, southern Africa. *Biological Reviews*, **78**, 597–638.
- Linder, H. P. (2005) Evolution of diversity: the Cape flora. *Trends in Plant Science*, **10**, 536–541.
- Linder, H. P. (2014) The evolution of African plant diversity. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **2**, 38.
- Lomolino, M. V. (2001) Elevation gradients of species-density: historical and prospective views. *Global Ecology and Biogeography*, **10**, 3–13.
- Lomolino, M. V., Riddle, B. R., Brown, J. H. i Brown, J. H. (2006) *Biogeography* (pp. 227–274). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

- Lomolino, M. V., Brown, J. H. i Sax, D. F. (2010) Island biogeography theory. *The theory of island biogeography revisited*, **1**, 13–51.
- Mackey, B. G., Berry, S. L. i Brown, T. (2008) Reconciling approaches to biogeographical regionalization: a systematic and generic framework examined with a case study of the Australian continent. *Journal of Biogeography*, **35**, 213–229.
- Manafzadeh, S., Staedler, Y. M. i Conti, E. (2016) Visions of the past and dreams of the future in the Orient: the Irano-Turanian region from classical botany to evolutionary studies. *Biological Reviews*, doi:10.1111/brv.12287.
- Manning, J. C. i Goldblatt, P. (1997) The *Moegistorrhynchus longirrostris* (Diptera: Nemestrinidae) pollination guild: long-tubed flowers and a specialized long-proboscid fly pollination system in Southern Africa. *Plant Systematics and Evolution*, **206**, 51–69.
- Mathee, C. A. i Robinson, T. J. (1997) Mitochondrial DNA phylogeography and comparative cytogenetics of the springhare, *Pedetes capensis* (Mammalia: Rodentia). *Journal of Mammalian Evolution*, **4**, 53–73.
- Médail, F. i Quezel, P. (1997) Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **84**, 112–127.
- Médail, F. i Diadema, K. (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.
- Meseguer, A. S., Aldasoro, J. J. i Sanmartín, I. (2013) Bayesian inference of phylogeny, morphology and range evolution reveals a complex evolutionary history in St. John's wort (*Hypericum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **67**, 379–403.
- Migliore, J., Baumel, A., Juin, M. i Médail, F. (2012) From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography*, **39**, 942–956.

- Migliore, J. *et al.* (2013) Surviving in mountain climate refugia: new insights from the genetic diversity and structure of the relict shrub *Myrtus nivellei* (Myrtaceae) in the Sahara Desert. *PloS ONE*, **8**, e73795.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005) *Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis*. Washington DC: Island Press.
- Mittermeier, R. A., Myers, N., Mittermeier, C. G. i Robles Gil, P. (2004) *Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC, **1**, 3–22.
- Mittermeier, R. A., *et al.* (2004) *Hotspots revisited*. Chicago: Chicago University Press.
- Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W., Brooks, T. M. i Gascon, C. (2011) Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In F.E. Zachos i J.C. Habel (Eds.), *Biodiversity Hotspots* (pp. 3–22). Berlin-Heildeberg: Springer.
- Moffett, R. O. (1979) The genus *Sarcocaulon*. *Bothalia*, **12**, 581–613.
- Molina-Venegas, R., Aparicio, A., Lavergne, S. i Arroyo, J. (2016) Climatic and topographical correlates of plant palaeo-and neoendemism in a Mediterranean biodiversity hotspot. *Annals of Botany*, **119**, 229–238.
- Monod, T. (1971) Remarques sur les symétries floristiques des zones sèches nord et sud en Afrique. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, **10**, 375–423.
- Morrone, J. J. (2014) Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*, **3782**, 1–110.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. i Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- De Nascimento, L., Willis, K. J., Fernández-Palacios, J. M., Criado, C. i Whittaker, R. J. (2009) The long-term ecology of the lost forests of La Laguna, Tenerife (Canary Islands). *Journal of Biogeography*, **36**, 499–514.

- Nicolas, V. *et al.* (2011) The roles of rivers and Pleistocene refugia in shaping genetic diversity in *Praomys misonnei* in tropical Africa. *Journal of Biogeography*, **38**, 191–207.
- Nowicke, J. W., Shetler, S. G. i Morin, N. (1992) Exine structure of pantoporate *Campanula* (Campanulaceae) species. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **79**, 65–80.
- Olesen, J. M., Alarcón, M., Ehlers, B. K., Aldasoro, J. J. i Roquet, C. (2012) Pollination, biogeography and phylogeny of oceanic island bellflowers (Campanulaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **14**, 169–182.
- Palazzesi, L., Gottschling, M., Barreda, V. i Weigend, M. (2012) First Miocene fossils of Vivianiaceae shed new light on phylogeny, divergence times, and historical biogeography of Geraniales. *Biological Journal of the Linnean Society*, **107**, 67–85.
- Pax, D. L., Price, R. A. i Michaels, H. J. (1997) Phylogenetic position of the Hawaiian geraniums based on rbcL sequences. *American Journal of Botany*, **84**, 72–78.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L. i McMahon, T. A. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, **4**, 439–473.
- Pelser, P. *et al.* (2012) The genetic ghost of an invasion past: colonization and extinction revealed by historical hybridization in *Senecio*. *Molecular Ecology*, **21**, 369–387.
- Percy, D. M. i Cronk, Q. C. (2002) Different fates of island brooms: contrasting evolution in *Adenocarpus*, *Genista*, and *Teline* (Genisteeae, Fabaceae) in the Canary Islands and Madeira. *American Journal of Botany*, **89**, 854–864.
- Philipson, W. R. (1948) Studies in the Development of the Inflorescence: V. The Raceme of *Lobelia dortmanna* L., and other Campanulaceous Inflorescences. *Annals of Botany*, **12**, 147–156.

- Plana, V. (2004) Mechanisms and tempo of evolution in the African Guineo-Congolian rainforest. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **359**, 1585–1594.
- Pokorny, L. (2015) Living on the edge: timing of Rand Flora disjunctions congruent with ongoing aridification in Africa. *Frontiers in Genetics*, **6**, 154.
- Price, R. A., Calie, P. J., Downie, S. R., Logsdon, J. M. i Palmer, J. D. (1990) Chloroplast DNA variation in the Geraniaceae. A preliminary report. *Proceeding of the International Geraniaceae Symposium*, **1**, 235–243.
- Price, R. A. i Palmer, J. D. (1993) Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geraniales from *rbcl* sequence comparisons. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**, 661–671.
- Quézel, P. (1978) Analysis of the flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **65**, 479–534.
- Raven, P. H. i Axelrod, D. I. (1974) Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **61**, 539–673.
- Richards, P. W. (1973) The tropical rain forest. *Scientific American*, **229**, 58–67.
- Rodríguez-Sánchez, F., Hampe, A., Jordano, P. i Arroyo, J. (2010) Past tree range dynamics in the Iberian Peninsula inferred through phylogeography and palaeodistribution modelling: a review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **162**, 507–521.
- Roquet, C., Sáez, L., Aldasoro, J. J., Susanna, A., Alarcón, M. L. i Garcia-Jacas, N. (2008) Natural delineation, molecular phylogeny and floral evolution in *Campanula*. *Systematic Botany*, **33**, 203–217.
- Roquet, C. *et al.* (2009) Reconstructing the history of Campanulaceae with a Bayesian approach to molecular dating and dispersal–vicariance analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**, 575–587.

- Sanmartín, I., Van Der Mark, P. i Ronquist, F. (2008) Inferring dispersal: A Bayesian approach to phylogeny-based island biogeography, with special reference to the Canary Islands. *Journal of Biogeography*, **35**, 428–449.
- Sanmartín, I., Anderson, C. L., Alarcón, M., Ronquist, F. i Aldasoro, J. J. (2010) Bayesian island biogeography in a continental setting: the Rand Flora case. *Biology Letters*, **6**, 703–707.
- Saunders, D. A., Hobbs, R. J. i Margules, C. R. (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology*, **5**, 18–32.
- Schrire, B. D., Lavin, M., Barker, N. P. i Forest, F. (2009) Phylogeny of the tribe Indigofereae (Leguminosae–Papilionoideae): Geographically structured more in succulent-rich and temperate settings than in grass-rich environments. *American Journal of Botany*, **96**, 816–852.
- Schmitt, C. B., Denich, M., Demissew, S., Friis, I. i Boehmer, H. J. (2010) Floristic diversity in fragmented Afrotropical rainforests: altitudinal variation and conservation importance. *Applied Vegetation Science*, **13**, 291–304.
- Schönland, S. (1889) Campanulaceae. *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, **4**, 40–70.
- Seely, M. K. i Louw, G. N. (1980) First approximation of the effects of rainfall on the ecology and energetics of a Namib Desert dune ecosystem. *Journal of Arid Environments*, **3**, 25–54.
- Senut, B., Pickford, M. i Ségalen, L. (2009) Neogene desertification of Africa. *Comptes Rendus Geoscience*, **341**, 591–602.
- Stafford, P. J. i Gibby, M. (1992) Pollen morphology of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *Review of Palaeobotany and Palynology*, **71**, 79–109.
- Stebbins, G. L. (1974) Flowering plants: evolution above the species level. *London: Arnold. Illustrations. General*, **18**, 399.
- Stevens, P. F. (2013) Angiosperm phylogeny website. Versió 1.3. Consultable a: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

- Struck, M. i Van der Walt, J. J. A. (1996) Floral structure and pollination in *Pelargonium*. *The Biodiversity of African Plants*, **1**, 631–638.
- Struck, M. (1997) Floral divergence and convergence in the genus *Pelargonium* (Geraniaceae) in Southern Africa: ecological and evolutionary considerations. *Plant Systematics and Evolution*, **208**, 71–97.
- Sytsma, K. J., Spalink, D. i Berger, B. (2014) Calibrated chronograms, fossils, outgroup relationships, and root priors: re-examining the historical biogeography of Geraniales. *Biological Journal of the Linnean Society*, **113**, 29–49.
- Takhtajan, A. (1986) Floristic regions of the world. *Berkeley, University of California Press*, **581**, 1.
- Thiv, M. *et al.* (2011) Old-New World and trans-African disjunctions of *Thamnosma* (Rutaceae): Intercontinental long-distance dispersal and local differentiation in the succulent biome. *American Journal of Botany*, **98**, 76–87.
- Thompson, J. D. (1999) Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity*, **82**, 229–236.
- Thompson, J. D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford: Oxford University Press.
- Thulin, M. (1975) The genus *Wahlenbergia s. lat.* (Campanulaceae) in tropical Africa and Madagascar. *Symbolae Botanicae Upsaliensis*, **21**, 1–223.
- Thulin, M. (1994) Aspects of disjunct distributions and endemism in the arid parts of the Horn of Africa, particularly Somalia. *Proceedings of the 13th Plenary Meeting*, **2**, 1105–1119.
- Touloumenidou, T., Bakker, F. T. i Albers, F. (2007) The phylogeny of *Monsonia* L. (Geraniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **264**, 1–14.

- Trauth, M. H., Larrasoana, J. C. i Mudelsee, M. (2009) Trends, rhythms and events in Plio-Pleistocene African climate. *Quaternary Science Reviews*, **28**, 399–411.
- Trewartha, G. T. i Horn, L. H. (1980). *An Introduction to climate*. Nova York: McGraw-Hill.
- Van Oudtshoorn, K. V. R. i Van Rooyen, M. W. (1999) *Dispersal Biology of Desert Plants*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Vargas, P. (2003) Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon*, **52**, 463–476.
- Vargas, P. (2007) Are Macaronesian islands refugia of relict plant lineages? A molecular survey. *Phylogeography of Southern European Refugia*, **1**, 297–314.
- Vela, E. i Benhouhou, S. (2007) Assessment of a new hotspot for plant biodiversity in the Mediterranean basin (north Africa). *Comptes Rendus Biologies*, **330**, 589–605.
- Venter, H. J. T. (1979) *A monograph of Monsonia L. (Geraniaceae)*. Wageningen: Landbouwhogeschool Wageningen.
- Venter, H. J. (1983) Phylogeography and interspecies relationships in *Monsonia* (Geraniaceae). *Bothalia*, **14**, 865–869.
- Verboom, G. A. *et al.* (2009) Origin and diversification of the Greater Cape flora: ancient species repository, hot-bed of recent radiation, or both? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **51**, 44–53.
- Verdcourt, B. (1969) The arid corridor between the north-east and south-west areas of Africa. *Palaeoecology of Africa*, **4**, 140–144.
- Verdú, M., Dávila, P., García-Fayos, P., Flores-Hernández, N. i Valiente-Banuet, A. (2003) ‘Convergent’ traits of mediterranean woody plants belong to pre-mediterranean lineages. *Biological Journal of the Linnean Society*, **78**, 415–427.

- Verhoeven, R. L. i Venter, H. J. T. (1986) Pollen morphology of *Monsonia*. *South African Journal of Botany*, **52**, 361–368.
- Vogel, S. (1998) Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic prespectives. Miscellaneous cases. *Flora*, **193**, 225–248.
- Wiens, J. J. i Graham, C. H. (2005) Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **36**, 519–539.
- Williams, K. J. *et al.* (2011) Forests of East Australia: the 35th biodiversity hotspot. *Biodiversity Hotspots*, **1**, 295–310.
- Winter, B. D. (1971) Floristic relationships between the northern and southern arid areas in Africa. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, **10**, 424-437.
- Yeo, P. F. (1990) The classification of Geraniaceae. *Proceedings of the International Geraniaceae symposium held at the University of Stellenbosch, Republic of South Africa*, **1**, 3–18.
- Yeo, P. (1993) Secondary pollen presentation. Form, function and evolution. *Plant Systematics and Evolution*, **6**, 268.

ORGANITZACIÓ I OBJECTIUS

1. Organització de la tesi doctoral

La present tesi doctoral s'ha estructurat en quatre capítols. Tots els capítols estan escrits en anglès i la seva estructura equival a la dels manuscrits científics. La lectura dels capítols pot ser aleatòria ja que són independents. El capítol 4 ha estat acceptat per la revista *Journal of Biogeography* (doi:10.1111/jbi.12997). Els altres tres capítols són manuscrits inèdits: el capítol 2 ha estat enviat a la revista *Scientific Reports*, mentre que els capítols 1 i 3 estan en fase de preparació per ser publicats en revistes incloses en el *Science Citation Index*.

El capítol 1 correspon a un estudi centrat en les geraniàcies, que té com objectiu principal reconstruir les relacions filogenètiques de la família i inferir l'origen geogràfic de la família i dels seus gèneres aplicant mètodes de datació molecular i de reconstrucció biogeogràfica. Per dur a terme aquest estudi, es van analitzar tres marcadors moleculars, dos cloroplàstics i un nuclear per tal d'obtenir una filogènia sòlida de les geraniàcies. Sobre la base d'aquesta filogènia, es va estudiar la diversificació de la família i es van realitzar reconstruccions dels caràcters ancestrals de trets morfològics que puguin haver estat clau per entendre els patrons evolutius d'aquesta família.

El capítol 2 és un treball que investiga l'evolució del gènere *Monsonia* (*Geraniaceae*) mitjançant inferència filogenètica i reconstrucció biogeogràfica per a investigar els diferents patrons i processos de dispersió que han succeït a Àfrica. Aquest treball integra metodologies de diferents disciplines. En primer lloc es va obtenir una filogènia datada, i es va dur a terme una reconstrucció biogeogràfica. En segon lloc, es va modelitzar i quantificar el nínxol d'aquestes espècies, i es va estimar l'evolució del nínxol climàtic. En tercer lloc, es va investigar el tipus de metabolisme fotosintètic (C_3 , C_4 , o CAM) per a les espècies de *Monsonia* per a les quals no es disposava d'informació bibliogràfica. Finalment, es va fer la reconstrucció de tres caràcters que han pogut jugar un paper important en la diversificació de *Monsonia*: i) el tipus d'hàbit (herba anual, herba perenne o planta suculenta); ii) el tipus de fruit (plomós o barbat); iii) i el tipus de metabolisme (plantas C_3 , C_4 o CAM). Una part dels resultats i conclusions d'aquest treball es van

incloure en una presentació oral a la *XI Edición de la Red Temática Ecoflor (Ecología y Evolución Floral)* organitzat per la *Universidad de Cádiz* el mes de febrer de 2014.

El capítol 3 és un cas d'estudi que reconstrueix la història evolutiva i biogeogràfica del grup *Azorina* de campanetes africanes i els esdeveniments de dispersió que van ocórrer entre el nord d'Àfrica i àrees adjacents com l'est d'Àfrica, la Macaronèsia, el sud d'Europa o la península d'Aràbia. En aquest treball es van realitzar les anàlisis filogenètiques amb quatre marcadors cloroplàstics. Un cop obtinguts els arbres filogenètics, vam centrar-nos en dos grups que presentaven les majors disjuncions intracontinentals: el grup de *Campanula keniensis* que inclou espècies distribuïdes al nord-oest i l'est d'Àfrica, a l'arxipèlag de Cap Verd i l'illa de Socotra, i el grup de *C. edulis* el qual comprèn espècies de nord, nord-oest, est d'Àfrica i la península d'Aràbia. Vam realitzar un estudi a nivell poblacional per analitzar quines han estat les rutes de dispersió i corredors dels ancestres d'aquests grups de campanetes.

El capítol 4 és un treball en el qual s'ha analitzat la història biogeogràfica del grup *Azorina*, un grup de *Campanula* distribuït principalment a Àfrica. En aquest capítol s'examina detalladament l'evolució d'un llinatge de *Campanula* present al nord d'Àfrica, la Macaronèsia i el sud de la península Ibèrica, amb l'objectiu d'estudiar el rol que ha jugat el nord d'Àfrica com a font i refugi de diversitat durant períodes climàtics adversos en comparació amb àrees veïnes. Aquest estudi integra dades macroevolutives i microevolutives: en primer lloc, es va realitzar una reconstrucció filogenètica del grup de campanetes africanes amb quatre marcadors cloroplàstics i dos nuclears per datar i inferir el seu origen biogeogràfic. En segon lloc, es va aprofundir en l'evolució d'un llinatge de dues espècies, *Campanula kremeri* i *C. occidentalis*, mitjançant la seqüenciació d'haplotips plastidials, AFLPs i la modelització del nínxol ecològic per tal de caracteritzar la distribució actual de la seva diversitat genètica i reconstruir els processos filogeogràfics que l'han generat.

2. Objectius generals

1. Aportar, des d'una perspectiva filogenètica, dades sobre l'origen, la història biogeogràfica i el temps de divergència dels gèneres que componen les geraniàcies (Capítol 1).
2. Comparar les dades filogenètiques i biogeogràfiques obtingudes amb els esdeveniments paleoclimàtics i paleogeogràfics per tal de valorar la validesa de les diferents hipòtesis proposades sobre l'origen d'aquesta família (Capítol 1).
3. Caracteritzar la diversitat morfològica de les *Geraniaceae*, reconstruir la seva evolució i investigar els efectes potencials de determinats trets sobre les taxes de diversificació de la família (Capítol 1).
4. Establir les relacions filogenètiques entre les espècies del gènere *Monsonia* utilitzant marcadors nuclears i cloroplàstics, estimar els temps de divergència entre llinatges i reconstruir la història biogeogràfica del gènere (Capítol 2).
5. Analitzar les dades filogenètiques amb caràcters morfològics i fotosintètics per tal d'esclarir la seva evolució en *Monsonia* i investigar el possible impacte en la diversificació del gènere i en la colonització d'ambients àrids (Capítol 2).
6. Determinar la distribució potencial actual de les espècies del gènere *Monsonia* utilitzant tècniques de modelització de nínxol ecològic i dades paleoambientals per tal de comprendre l'adaptació a ambients àrids i l'evolució de la flora africana (Capítol 2).
7. Establir i datar les relacions filogenètiques del grup d'espècies africanes de *Campanula* amb marcadors cloroplàstics i nuclears, i reconstruir les àrees ancestrals d'aquests tàxons relacionant-les amb esdeveniments passats (Capítols 3 i 4).

8. Reconstruir els esdeveniments de colonització i dispersió que van ocórrer al nord d'Àfrica i àrees adjacents en les espècies del grup *Azorina* mitjançant mètodes d'anàlisi biogeogràfics (Capítol 3).
9. Examinar si l'evolució del tipus d'hàbit (anual o perenne) hauria afavorit les migracions de les espècies del grup *Azorina* entre la Macaronèsia, el nord-oest i l'est d'Àfrica (Capítol 3).
10. Analitzar els patrons filogeogràfics en l'evolució d'un llinatge format per una espècie macaronèsica (*C. occidentalis*) i espècie distribuïda al nord d'Àfrica i la península Ibèrica (*C. kremeri*), mitjançant haplotips cloroplàstics i nuclears, i marcadors hipervariables AFLPs. Detectar possibles barreres geogràfiques que hagin impedit el flux gènic i identificar els esdeveniments de colonització i refugis potencials d'aquest llinatge (Capítol 4).
11. Estimar la distribució ancestral de *C. kremeri* i *C. occidentalis* emprant tècniques de modelització de nínxol i dades paleoclimàtiques per reconstruir els principals esdeveniments de dispersió entre el nord d'Àfrica, la península Ibèrica, la Macaronèsia i àrees adjacents, amb especial interès en els períodes glacials i interglacials del pliocè-plistocè (Capítol 4).
12. Examinar la congruència entre filogènies obtingudes a partir de les dades de l'ADN nuclear i cloroplàstic de *C. kremeri* i *C. occidentalis*, amb la finalitat d'avaluar possibles fenòmens d'introgressió o de flux gènic interespecífic (Capítol 4).

MATERIALS I MÈTODES

1. Materials

1.1. Grups d'estudi i mostreig

En aquesta tesi doctoral s'han dut a terme mostreigs d'espècies de les dues famílies d'interès, les campanulàcies i les geraniàcies, amb especial èmfasi en les espècies africanes de *Campanula* (23 espècies) i amb un mostreig exhaustiu del gènere *Monsonia* (34 espècies, representant el 87,2% de totes les espècies del gènere). El material de totes aquestes espècies s'ha obtingut en campanyes de recol·lecció i expedicions realitzades per membres del grup d'investigació, però també per part d'altres investigadors de l'Institut Botànic de Barcelona, el *Real Jardín Botánico* de Madrid, la Universitat Autònoma de Barcelona i la Universitat de Barcelona. Les àrees amb un mostreig més exhaustiu han estat la zona del sud d'Àfrica, la conca mediterrània, les muntanyes del nord d'Àfrica i la Macaronèsia. Alguns tàxons s'han cultivat als hivernacles de l'Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB) i del *Real Jardín Botánico* de Madrid.

Deguda la impossibilitat d'obtenir material fresc d'algunes espècies en concret, s'han visitat o demanat als següents herbaris material sec procedent de plecs: Institut Botànic de Barcelona (BC), Universitat de Barcelona (BCN), *University of Coimbra* (COI), *National Museums of Kenya* (EA), *Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève* (G), *Komarov Botanical Institute* (LE), *Real Jardín Botánico* (MA), *Johannes Gutenberg-Universität* (MJG), *Missouri Botanical Garden* (MO), *Westfälische Wilhelms-Universität* (MSUN), *Muséum National d'Histoire Naturelle* (P), *South African National Biodiversity Institute* (PRE), *University of Stellenbosch* (STEU), *Naturhistorisches Museum Wien* (W) i *Universität Wien* (WU)

2. Mètodes

2.1. Extracció, amplificació i seqüenciació d'ADN

L'extracció de l'ADN es va realitzar a partir de 20–25 mg de material sec, principalment fulles, que van ser triturades mitjançant un morter automàtic i es van processar seguint les instruccions del fabricant *DNeasy Plant Kit* (*Qiagen Inc.*,

Califòrnia, EUA). L'ADN va ser eluït amb un tampó d'elució obtenint un volum final d'entre 25 i 70 µl. Es va realitzar un gel d'agarosa a l'1% tenyit amb *SYBR Safe* (*Applied Biosystems*) per estimar la quantitat d'ADN. Mitjançant eines fotomètriques (un transil·luminador de llum ultraviolada) i el programari d'anàlisi Kodak 1D.

Les reaccions d'amplificació de l'ADN es van dur a terme mitjançant PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Es van realitzar en diferents termocicladors de l'Institut Botànic de Barcelona: PTC-100, PTC-200 (*MJ Research Inc.*, Massachusetts, EUA), o *G-Storm* (*GRI Labcare*, Essex, Regne Unit). El volum total de la reacció era de 25 µl: 1 µl d'ADN eluït, 2,5 µl d'encebadors a una concentració de 5 µM, 2,5 µl de dNTPs a 1 mM, 5 µl de tampó 10x, 2,5 µl MgCl₂ a 25 mM, 0,5 unitats de polimerasa *EcoTaq*, i 16 µl d'aigua purificada.

El producte amplificat resultant de la PCR es va tractar amb *ExoSAP-IT* (*USB Corporation*, Ohio, EUA) i es va enviar a *Macrogen Inc.* (Seül, Corea del Sud) i a *StarSeq* (Mainz, Alemanya) per a la seqüenciació. Les seqüències de cada regió van ser alineades amb MAFFT v. 5 (Kato *et al.*, 2005) i comprovades usant el programa BioEdit v. 7.2.6 (Hall, 1999). Les regions de l'ADN analitzades i els protocols de PCR estan resumits en la taula 1.

Taula 1. Llistat de parells d'encebadors, els autors i els programes de PCR.

Encebador	Seqüència	Autor o autors	Pre-tractament	Tractament
<i>trnL^{UAA}-F</i>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991	1 min a 96°C	30 cicles d'1 min a 96°C, 1 min a 50°C, 2 min a 72°C, Pas final: 10 min a 72°C
<i>trnF^{GAA}-R</i>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG			
<i>trnS^{GCU}-F</i>	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	Hamilton, 1999	1 min a 96°C	30–40 cicles de 45s a 96°C, 1,5 min–2 min a 45°C–54°C, 1,5 min–2 min a 72°C Pas final: 10 min a 72°C
<i>trnG^{UCC}-R</i>	GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C			
<i>rbcL¹-F</i>	ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC	Olmstead <i>et al.</i> , 1992	1 min a 95°C	30 cicles d'1 min a 95°C, 30s–1 min a 48–50°C, 2 min a 72°C, Pas final: 10 min a 72°C
<i>rbcL⁷²⁴-R</i>	TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC			
<i>matK⁵-F</i>	GTA TCG CAC TAT GTA TCA TTT GA	Johnson i Soltis, 1995	3 min a 95°C	35 cicles de 30s a 95°C, 4s a 47°C, 1 min 30s a 72°C, Pas final: 10 min a 72°C
<i>matK^{C2M}-R</i>	CAC ACG GCT TTC CCT ATG TAT AC	Haberle <i>et al.</i> , 2009		
<i>ITS^{1A}-F</i>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> , 1990	5 min a 95°C	38 cicles de 30s a 95°C, 30s a 52°C, 1 min a 72°C, Pas final: 10 min a 72°C
<i>ITS⁴-R</i>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC			
<i>PPR11-F</i>	TTTGTTATGTTGATKTGGGTTTT	Crowl <i>et al.</i> , 2014	2 min a 95°C	32 cicles d'1 min a 95°C, 1 min a 48°C, 2 min a 72°C, Pas final: 12 min a 72°C
<i>PPR11-R</i>	GCCAGAAATAATAGCCGTGTAAG			
<i>PPR70-F</i>	AGTGCTYTGATTCATGGGTTGTG	Crowl <i>et al.</i> , 2014	2 min a 95°C	32 cicles d'1 min a 95°C, 1 min a 48°C, 2 min a 72°C, Pas final: 12 min a 72°C
<i>PPR70-R</i>	ACAGCTCKRACAAGTATRTTCCA			
<i>petB¹³⁶⁵-F</i>	TTG ACY CGT TTT TAT AGT TTA	Löhne i Borsch, 2005	1,5 min a 96°C	34 cicles de 30s a 95°C, 1 min a 50°C, 1 min 30s a 72°C, Pas final: 20 min a 72°C
<i>petD⁷³⁸-R</i>	AAT TTA GCY CTT AAT ACA GG			
<i>rpl32-F</i>	CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C	Shaw <i>et al.</i> , 2007	5 min a 80°C	30 cicles d'1 min a 95°C, 1 min a 50°C, una rampa de 0.3°C/s a 65°C, Pas final: 5 min a 65°C
<i>trnL^{UAG}-R</i>	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT			

Les anàlisis filogenètiques es van dur a terme en matrius separades i concatenades de seqüències nuclears i plastidials. Els temps de divergència es van estimar amb mètodes d'inferència bayesiana implementats a BEAST v. 1.7.5 (Drummond i Rambaut, 2007) i usant el mètode de rellotge relaxat amb taxes no correlacionades extretes d'una distribució logarítmica normal. Es va seleccionar el model d'especiació *birth-death* perquè té en compte els processos d'especiació i extinció. Les distribucions posteriors de les estimacions dels paràmetres es van comprovar amb Tracer v. 1.4.1 (Drummond i Rambaut, 2007) i els arbres es van consensuar en un arbre de màxima credibilitat (MCC) amb TreeAnnotator v. 1.6.6 (Drummond i Rambaut, 2007), després d'excloure una fracció del *burn-in* del 20%.

En el cas del llinatge de *Campanula kremeri* i *C. occidentalis*, el test ILD va ser incongruent pels marcadors nuclears i cloroplàstics, i es realitzaren dues anàlisis de BEAST independents (una pel conjunt de dades nuclears i una altra per les cloroplàstiques). S'obtingueren topologies diferents pels dos arbres resultants. Conseqüentment, es construí una xarxa filogenètica arrelada amb Dendroscope v. 3 (Huson i Scornavacca, 2012) per buscar possibles esdeveniments d'hibridació. S'utilitzaren dos conjunts de 1.000 arbres mostrejats a l'atzar de les anàlisis nuclear i cloroplàstica de BEAST. Es construí una xarxa *level-K*, en la qual les reticulacions es van limitar a les branques presents en el 95% dels arbres de cada conjunt de dades. També s'estudiaren en detall la incongruència entre els dos conjunts de dades emprant *BEAST (Heled i Drummond, 2010). Finalment, es construí un arbre per inferir l'origen geogràfic dels llinatges que havien estat afectats per esdeveniments de reticulació. Per a visualitzar i resumir les possibles topologies d'aquests arbres s'utilitzà el programa Densitree v. 2.0 (Bouckaert, 2010).

Per reconstruir l'evolució espai-temporal dels grups d'estudi, es va utilitzar el paquet *BioGeoBEARS* v. 0.2.1 (Matzke, 2014) implementat en el llenguatge de programació R (R Core Team, 2014). Aquest programari permet comparar diferents models biogeogràfics i realitzar la inferència biogeogràfica en base al model més adequat. La implementació de diversos models en un marc comú permet utilitzar el criteri d'informació d'Akaike (AIC) per comparar objectivament

aquests models i les hipòtesis sobre els processos biogeogràfics que operen en els diferents clades i regions, i escollir el millor model en cada cas. Concretament, *BioGeoBEARS* permet comparar els models DIVA (Ronquist, 1997), DEC (Ree i Smith, 2008) i també el model BayArea (Landis *et al.*, 2013). A més, aquests tres models es poden modificar afegint-hi el paràmetre "+J", amb el qual s'inclou la possibilitat que la distribució actual de les espècies s'hagi vist afectada per esdeveniments d'especiació per efecte fundador. Aquest tipus de fenomen consisteix en un esdeveniment de colonització a llarga distància (per part de pocs individus) que resulta en un aïllament complet i instantani de la població resultant respecte a la població ancestral.

2.2. Anàlisi de diversitat genètica i estructura poblacional basades en AFLPs

Els AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) són un dels marcadors més usats en estudis filogeogràfics de plantes a escala intraespecífica (Skrede *et al.*, 2009). Aquests marcadors són fragments d'ADN de diferent llargària obtinguts amb enzims de restricció i encebadors específics. Es considera que els fragments que presenten la mateixa mida ocupen la mateixa posició al genoma, és a dir, que són homòlegs. Amb aquesta tècnica "d'empremta genètica" es poden detectar múltiples *loci* polimòrfics en el genoma. Els AFLPs combinen la tècnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) amb l'ampliació selectiva mitjançant PCR (Vos *et al.*, 1995; Blears *et al.*, 1998; Savelkoul *et al.*, 1999). Els AFLPs tenen un cost relativament baix, amb elevada reproductibilitat i capacitat de generar molts marcadors polimòrfics i, alhora, no necessiten informació genètica prèvia per a la seva aplicació.

Les anàlisis d'AFLPs es van realitzar seguint el procediment de Vos *et al.* (1995) i segons els protocols estàndards d'AFLP *Plant Mapping* (*PE Applied Biosystems*). L'ADN de cada mostra es va digerir simultàniament amb enzims de restricció *EcoRI* i *MseI*, lligats amb els adaptadors *EcoRI* (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3') i *MseI* (5'-GACGATGAGTCCTGAC-3'/5'-ATCTCAGGACTCAT-3'), utilitzant les següents condicions per totes les mostres: 5,5 µl d'ADN (c. 150–200 ng); 1,1 µl de *Buffer* T4

DNA lligasa (10x); 1,1 µl de NaCl (0,5 M); 0,55 µl de BSA (*bovine serum albumine*, 1mg/ml); 1 µl d'adaptador *EcoRI* (10 µM); 1 µl d'adaptador *MseI* (10 µM); 0,125 µl d'enzim *EcoRI*; 0,1 µl d'enzim *MseI* i 0,2 µl d'enzim T4 DNA lligasa, en un volum total d'11 µl. La reacció es va incubar durant 3 hores a 37°C, i, seguidament, una altra incubació a 16°C durant tota la nit. El producte resultant de la restricció-lligació va ser diluït 10 vegades en aigua destil·lada.

En totes les reaccions de restricció-lligació i d'amplificació, s'emprà el termociclador *Mastercycler Ep d'Eppendorf*. Per l'amplificació preselectiva de la restricció-lligació de l'ADN, s'utilitzaren dos encebadors amb un nucleòtid selectiu a l'extrem 3': *EcoRI-A* (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') i *MseI-C* (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'). El termociclador es programà amb les condicions següents: una fase inicial de 2 min a 72°C; seguida de 30 cicles de desnaturalització (30s, 94°C), hibridació (30s, 56°C) i amplificació (1 min, 72°C); per últim, es deixà reposar i s'incubà la reacció durant 10 min a 72°C.

L'amplificació selectiva es va realitzar utilitzant els encebadors selectius (*EcoRI* i *MseI*) amb dos nucleòtids addicionals a l'extrem 3' i els marcadors fluorescents 6-FAM i VIC a l'extrem 5' de l'encebador *EcoRI*. Les condicions utilitzades en la PCR selectiva van ser: incubació inicial durant 10 min a 95°C, per activar l'enzim *AmpliTaq Gold*; 13 cicles de desnaturalització (30s, 94°C), hibridació (1 min, 65°C) i amplificació (1 min, 72°C), amb una disminució de 0,7°C de la temperatura d'hibridació en cada cicle. Posteriorment, 24 cicles de desnaturalització (30s, 94°C), hibridació (1 min, 56°C) i amplificació (1 min, 72°C), i, per acabar, una fase final d'incubació durant 10 min a 72°C. Es va realitzar un estudi pilot previ per escollir els encebadors, i assegurar-nos que generaven un nombre suficient de fragments polimòrfics. La detecció dels fragments generats es va realitzar amb un seqüenciador automàtic capil·lar *ABI PRISM 3730* de 48 capil·lars (*Applied Biosystems*).

Un cop obtinguts els fragments de cada combinació d'encebadors, es van processar i analitzar amb el programa *GeneMapper v. 4.0* (*Applied Biosystems*), i es van generar automàticament matrius de bandes de presència (1) i absència (0), on l'absència indica que hi ha hagut una mutació principal en la diana de restricció. Es van comparar aquestes matrius amb els electroforetogrames i es van corregir

manualment les bandes ambigües. Es van comparar les bandes de 80 a 500 bp (parells de bases) de totes les mostres.

Es comprovà la reproductibilitat de la tècnica repetint tot el procés amb un o dos individus de cada població. Per a calcular la proporció de fragments polimòrfics i la variabilitat genètica, dins i entre poblacions, s'utilitzà el programa AFLP-SURV v. 1.0 (Vekemans *et al.*, 2002). Les freqüències al·lèliques dels fragments d'AFLPs es van calcular amb mètodes bayesians i amb una distribució prèvia no uniforme de les freqüències (Zhivotovsky, 1999).

Es van calcular els valors de diversitat i d'estructura genètica de les poblacions segons el criteri de Lynch i Milligan (1994). En cada població es va estimar el nombre de fragments per població, el nombre i percentatge d'al·lels polimòrfics, i la diversitat genètica de Nei. També es va calcular el nombre de fragments privats (aquells que només apareixen en una població) i el nombre de fragments rars (els que són presents en menys del 10% dels individus) (Stehlik *et al.*, 2001).

Els estudis comparatius entre parells de poblacions es van realitzar amb AFLP SURV v. 1.0, assumint una autofecundació parcial i equilibri de Hardy-Weinberg. La significació d'aquests es va avaluar amb 1.000 *bootstraps* i 10.000 permutacions a l'atzar. Les distàncies genètiques entre parells de poblacions es van calcular utilitzant el *Fixation index* (F_{ST}) i l'índex de Nei (Nei i Li, 1979) i es van emprar per construir un dendograma *Neighbour-Joining* (NJ). Aquest es va relacionar amb les distàncies geogràfiques mitjançant regressions o el test de Mantel (Mantel, 1967), amb el programa NTSYS PC v. 2.0 (Rohlf, 1998). També amb aquest programa es van representar les relacions entre els individus en un arbre NJ, basat en distàncies de Nei i Li.

L'estructura genètica de les poblacions es va estudiar amb el programa STRUCTURE v. 2.3 (Hubisz *et al.*, 2009). Per a identificar possibles localitzacions geogràfiques que van actuar com a barreres de flux gènic s'utilitzà el programa BARRIER v. 2.2 (Manni i Guérard, 2004). La diferenciació genètica entre poblacions i entre regions genètiques es va avaluar amb una anàlisi molecular de la variances (AMOVA), fent servir ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Per obtenir valors

significatius de variances, es van realitzar 1.000 permutacions en cada anàlisi d'AMOVA.

2.3. Anàlisis filogeogràfiques

En filogeografia, per inferir la història evolutiva d'una espècie o espècies properes, es poden reconstruir les relacions evolutives entre seqüències intraespecífiques o entre haplotips (Bloomquist *et al.*, 2010). Per a visualitzar aquestes relacions s'utilitzà un dels mètodes més populars: les xarxes d'haplotips estimades amb el programa TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Amb aquest programari, les connexions entre haplotips representen esdeveniments de coalescència basats en diferents assumpcions o prediccions: a) els haplotips més antics probablement se situaran a l'interior de la xarxa, b) els haplotips més freqüents tendeixen a tenir més connexions, c) els haplotips amb una única connexió solen estar connectats a haplotips de la mateixa població que presenten múltiples connexions (Posada i Crandall, 2001).

Un cop obtingudes les dades moleculars, es mesurà la diversitat genètica intrapoblacional i interpoblacional amb eines estadístiques. Amb el programari DNAsp v. 5 (Librado i Rozas, 2009) s'estimaren les diversitats haplotípica i nucleotídica, i la D de Tajima, entre d'altres paràmetres genètics. Amb aquestes dades es poden rastrejar els esdeveniments de migració passats utilitzant l'anàlisi filogeogràfica discreta (DPA) de Lemey *et al.* (2009), implementat a BEAST v. 1.7.1. Per a identificar les possibles rutes de migració s'usà el mètode BSSVS (*Bayesian stochastic search variable selection*) amb el programa Spread v. 1.0.6 (Bielejec *et al.*, 2011) el qual recolza estadísticament les possibles rutes de dispersió amb *Bayes Factors*.

2.4. Models de distribució d'espècies

Els models de distribució d'espècies (SDM) fan referència a un conjunt d'eines estadístiques que permeten predir la distribució geogràfica d'una o més espècies a partir d'un nombre mínim de dades de presència del tàxon estudiat i de dades ambientals (climàtiques, de tipus de sòl, etcètera) (Franklin, 1995; Guisan i

Thuiller, 2005; Swenson, 2008). Aquests models també poden servir per detectar àrees que van actuar com a refugis en el passat (Gavin *et al.*, 2014), patrons de diversitat (Hortal, 2008), per realitzar estudis de conservació (Rodríguez *et al.*, 2007) o estudis filogeogràfics (Waltari i Guralnick, 2009), per delimitar *hotspots* de biodiversitat (Richardson *et al.*, 2006) o per predir canvis en la distribució de les espècies en el futur deguts al canvi climàtic (Pagel i Schurr, 2012). Hi ha molts mètodes per inferir mapes de distribució; en aquesta tesi s'utilitzà un dels més emprats, el programa MaxEnt v. 3.3 (Phillips *et al.*, 2006), el qual es basa en els principis de màxima entropia. Tot i els darrers avenços, aquests sistemes de modelització encara presenten algunes limitacions, com ara la dificultat d'obtenir models fiables per a espècies generalistes (Papeş i Gaubert, 2007) o la baixa resolució a l'hora de detectar microclimes.

Els models de distribució d'espècies inclouen informació de material procedent de plecs d'herbari i de les nostres col·leccions. Les coordenades geogràfiques es van obtenir a partir de les coordenades GPS de les etiquetes dels espècimens o de localitats georeferenciades. Es reconstruïren els SDM per inferir les distribucions potencials dels tàxons d'interès sota condicions climàtiques presents i passades. Les condicions passades van ser projectades en dues capes del quaternari tardà, i en dos períodes: l'últim període interglacial (LIG, c. 80 ka, model d'Otto-Bliesner *et al.*, 2006), i l'últim màxim glacial (LGM, c. 21 ka) que va ser construït sota dos models diferents: el model de *Community Climate System Model* (CCSM; Collins *et al.*, 2006) i el model de *Model for Interdisciplinary Research on Climate* (MIROC; Hasumi i Emori, 2004).

Les variables bioclimàtiques, degudament retallades per a cobrir l'àrea de distribució de les espècies analitzades, s'obtingueren en les pàgines web *WorldClim* (Hijmans *et al.*, 2005) i *CliMond* (Kriticos *et al.*, 2012). Es van descartar les variables que estaven altament correlacionades ($r > 0,7$). Per a avaluar la precisió del model de distribució d'espècies, les localitats van ser separades aleatòriament en dades *training* (75%), utilitzades per a construir el model, i dades *test* (el 25% restant), i es van fer 10 rèpliques.

2.5. *Evolució de caràcters continus i discrets*

L'evolució de caràcters continus es va inferir mitjançant una reconstrucció ancestral dels caràcters (ASR) implementat en el paquet d'R *phytools* v. 0.3-93 (Revell, 2012). Per triar el model d'evolució que més s'adequava a les nostres dades, s'utilitzà el paquet d'R *geiger* v. 2.0.6 (Harmon *et al.*, 2008). Aquest programa permet fer la reconstrucció sota diferents models d'evolució que són comparats amb el criteri corregit d'informació d'Akaike (AICc). S'escollí la funció ancML de *phytools* per inferir els estats ancestrals en cada node de l'arbre consens, i la funció contMap, d'aquest mateix paquet, per representar gràficament aquests caràcters continus en la filogènia (Revell, 2012).

Per inferir l'evolució de caràcters discrets, es reconstruïren els caràcters ancestrals utilitzant el mètode bayesià descrit per Pagel *et al.* (2004) i Pagel i Meade (2006), implementat en BayesTraits v. 2.0 (Pagel i Meade, 2014). En aquesta anàlisi, es va utilitzar una mostra d'arbres obtinguts de l'algoritme *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) de l'anàlisi de BEAST. Aquest algoritme genera cadenes d'arbres que van córrer 10^8 generacions, de les quals es mostrejava cada 1.000 generacions. Les primeres 10^7 generacions es van descartar com a *burn-in*. Cada anàlisi es va dur a terme tres vegades per comprovar que les cadenes MCMC havien arribat a una convergència.

Finalment, es comprovà si havia correlació entre les variables contínues i discretes i es realitzaren les anàlisis filogenètiques de mínims quadrats generalitzats (PGLS; Martins i Hansen, 1997), utilitzant la funció gls del paquet d'R *nlme* v.3.1-117 (Pinheiro *et al.*, 2014). Les regressions PGLS permeten estimar la correlació entre dos o més caràcters tenint en compte l'estructura filogenètica dels llinatges; és a dir, permeten corregir el fet que les espècies no són independents entre elles.

2.6. *Determinació d'isòtops de carboni*

En el cas del gènere *Monsonia* es realitzà un ampli examen de les relacions d'isòtops de carboni ($\delta^{13}\text{C}$) per detectar el tipus de metabolisme (C_3 , C_4 o CAM) que presenten les espècies del gènere. Els dos enzims principals que determinen la fixació de carboni i, per tant, el tipus de metabolisme, són la RuBP carboxilasa i la PEP carboxilasa, els quals fraccionen els isòtops estables de carboni 12 i 13 de manera desigual (Smith i Epstein, 1971). S'estima que els valors d'isòtops $\delta^{13}\text{C}$ d'entre -22‰ i -33‰ corresponen a espècies C_3 , i d'entre -9‰ i -18‰ a espècies típicament C_4 i CAM obligades (Pierce *et al.*, 2002), mentre que els valors de $\delta^{13}\text{C}$ per plantes típicament CAM estan entre -20‰ i -10‰. La proporció d'isòtops de carboni es va mesurar a partir d'uns 2 mg de mostra de fulles seques i utilitzant un espectròmetre de masses (Smith i Epstein, 1971). Les mostres es van analitzar a l'espectròmetre de masses de l'*Institut für Geowissenschaften* de la Universitat de Mainz (Alemanya). Els valors de $\delta^{13}\text{C}$ es van calcular d'acord amb el mètode de Craig (Craig, 1957) i els resultats es van expressar en valors de $\delta^{13}\text{C}$ expressats en relació amb l'estàndard PDB.

Referències bibliogràfiques

- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. A. i Lemey, P. (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, **27**, 2910–2912.
- Blears, M. J., De Grandis, S. A., Lee, H. i Trevors, J. T. (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology i Biotechnology*, **21**, 99–114.
- Bloomquist, E. W., Lemey, P. i Suchard, M. A. (2010) Three roads diverged? Routes to phylogeographic inference. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**, 626–632.
- Bouckaert, R. R. (2010) DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **26**, 1372–1373.

- Clement, M., Posada, D. i Crandall, K. A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1659.
- Collins, W. D. *et al.* (2006) The community climate system model version 3 (CCSM3). *Journal of Climate*, **19**, 2122–2143.
- Craig, H. (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **12**, 133–149.
- Crowl, A. A. *et al.* (2014) Phylogeny of Campanuloideae (Campanulaceae) with emphasis on the utility of nuclear pentatricopeptide repeat (PPR) genes. *PloS ONE*, **9**, e94199.
- Drummond, A. J. i Rambaut, A. (2007) Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Excoffier, L., Laval, G. i Schneider, S. (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution and Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G. i Bult, C. (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**, 315–319.
- Franklin, J. (1995) Predictive vegetation mapping: geographic modelling of biospatial patterns in relation to environmental gradients. *Progress in Physical Geography*, **19**, 474–499.
- Gavin, D. G. *et al.* (2014) Climate refugia: joint inference from fossil records, species distribution models and phylogeography. *New Phytologist*, **204**, 37–54.
- Guisan, A. i Thuiller, W. (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters*, **8**, 993–1009.
- Haberle, R. C. *et al.* (2009) Taxonomic and biogeographic implications of a phylogenetic analysis of the Campanulaceae based on three chloroplast genes. *Taxon*, **58**, 715–734.

- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Hamilton, M. (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521–523.
- Harmon, L. J., Weir, J. T., Brock, C. D., Glor, R. E. i Challenger, W. (2008) GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics*, **24**, 129–131.
- Hasumi, H. i Emori, S. (2004) *K-1 coupled gcm (miroc) description*. Tòquio: Center for Climate System Research, University of Tokyo.
- Heled, J. i Drummond, A. J. (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 570–580.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. i Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965–1978.
- Hortal, J. (2008) Uncertainty and the measurement of terrestrial biodiversity gradients. *Journal of Biogeography*, **35**, 1335–1336.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M. i Pritchard, J. K. (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1322–1332.
- Huson, D. H. i Scornavacca, C. (2012) Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology*, **61**, 1061–1067.
- Johnson, L. A. i Soltis, D. E. (1995) Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using matK sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**, 149–175.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. i Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, **33**, 511–518.

- Kriticos, D. J. *et al.* (2012) CliMond: global high-resolution historical and future scenario climate surfaces for bioclimatic modelling. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 53–64.
- Landis, M. J., Matzke, N. J., Moore, B. R. i Huelsenbeck, J. P. (2013) Bayesian analysis of biogeography when the number of areas is large. *Systematic Biology*, **62**, 789–804.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J. i Suchard, M. A. (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*, **5**, e1000520.
- Librado, P. i Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Lynch, M. i Milligan, B. G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91–99.
- Löhne, C. i Borsch, T. (2005) Molecular evolution and phylogenetic utility of the *petD* group II intron: a case study in basal angiosperms. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 317–332.
- Manni, F. i Guérard, E. (2004) *BARRIER, version 2.2 Manual*. Population Genetics team. París: Museum of Mankind.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- Martins, E. P. i Hansen, T. F. (1997) Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. *The American Naturalist*, **149**, 646–667.
- Matzke, N. J. (2014) Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. *Systematic Biology*, **63**, 951–970.
- Nei, M. i Li, W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 5269–5273.

- Olmstead, R. G., Michaels, H. J., Scott, K. M. i Palmer, J. D. (1992) Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **79**, 249–265.
- Otto-Bliesner, B. L., Marshall, S. J., Overpeck, J. T., Miller, G. H. i Hu, A. (2006) Simulating Arctic climate warmth and icefield retreat in the last interglaciation. *Science*, **311**, 1751–1753.
- Pagel, M., Meade, A. i Barker, D. (2004) Bayesian estimation of ancestral states on phylogenies. *Systematic Biology*, **53**, 673–684.
- Pagel, M. i Meade, A. (2006) Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *The American Naturalist*, **167**, 808–825.
- Pagel, J. i Schurr, F. M. (2012) Forecasting species ranges by statistical estimation of ecological niches and spatial population dynamics. *Global Ecology and Biogeography*, **21**, 293–304.
- Pagel, M. i Meade, A. (2014) BayesTraits Version 2.0 Computer Package. Consultable a: <http://www.evolution.rdg.ac.uk>
- Papeş, M. i Gaubert, P. (2007) Modelling ecological niches from low numbers of occurrences: assessment of the conservation status of poorly known viverrids (Mammalia, Carnivora) across two continents. *Diversity and Distributions*, **13**, 890–902.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. i Schapire, R. E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231–259.
- Pierce, S., Winter, K. i Griffiths, H. (2002) Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. *New Phytologist*, **156**, 75–83.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S. i Sarkar, D. (2014) R Core Team (2014) *nlme*: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.

- Posada, D. i Crandall, K. A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 37–45.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Viena, Àustria. Disponible a <http://www.R-project.org/>.
- Ree, R. H. i Smith, S. A. (2008) Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology*, **57**, 4–14.
- Revell, L. J. (2012) *phytools*: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 217–223.
- Richardson, B. J., Zabka, M., Gray, M. R. i Milledge, G. (2006) Distributional patterns of jumping spiders (Araneae: Salticidae) in Australia. *Journal of Biogeography*, **33**, 707–719.
- Rodríguez, J. P., Brotons, L., Bustamante, J. i Seoane, J. (2007) The application of predictive modelling of species distribution to biodiversity conservation. *Diversity and Distributions*, **13**, 243–251.
- Rohlf, F. J. (1998) *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, v.1.80*. Nova York: Exeter Software.
- Ronquist, F. (1997) Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology*, **46**, 195–203.
- Savelkoul, P. H. M. *et al.* (1999) Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 3083–3091.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E. i 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.

- Skrede, I., Borgen, L. i Brochmann, C. (2009) Genetic structuring in three closely related circumpolar plant species: AFLP versus microsatellite markers and high-arctic versus arctic–alpine distributions. *Heredity*, **102**, 293–302.
- Smith, B. N. i Epstein, S. (1971) Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiology*, **47**, 380–384.
- Stehlik, I., Schneller, J. J. i Bachmann, K. (2001) Resistance or emigration: response of the high-alpine plant *Eritrichium nanum* (L.) Gaudin to the ice age within the Central Alps. *Molecular Ecology*, **10**, 357–370.
- Swenson, N. G. (2008) The past and future influence of geographic information systems on hybrid zone, phylogeographic and speciation research. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**, 421–434.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. i Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105–1109.
- Vekemans, X. (2002) *AFLP-SURV version 1.0*. Brussel·les: Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles.
- Vos, P. *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407–4414.
- Waltari, E. i Guralnick, R. P. (2009) Ecological niche modelling of montane mammals in the Great Basin, North America: examining past and present connectivity of species across basins and ranges. *Journal of Biogeography*, **36**, 148–161.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. i Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, **38**, 315–322.
- Zhivotovsky, L. A. (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, **8**, 907–913.

CAPÍTOL 1

Diversification, biogeographic history and fruit evolution of Geraniaceae

Abstract

All five Mediterranean-type ecosystems (south-western and southern Australia, southern California and northern Baja California, the Cape region of South Africa, central Chile, and the Mediterranean Basin) harbour a unique species diversity. Within these five regions, the two richest ones in terms of plant diversity are the Cape Floristic Region and the Mediterranean Basin. The processes and patterns that led to the settlement of these floras around the globe remain unclear. The family Geraniaceae constitutes an ideal case study to analyse the dispersal events between Mediterranean-type ecosystems as the family presents its diversity centres in these type of biomes. In this study, we reconstructed the biogeographic history of Geraniaceae including an extensive dataset representing all the genera within the family and we investigated the evolution of key characters that likely favoured the colonisation of different habitats. According to our data, the split of the five Geraniaceae genera occurred in the Oligocene, though their diversification took place during the Miocene. *Pelargonium* and *Monsonia* inhabit mainly the Cape region and the adjacent arid areas, from where their ancestor likely dispersed to the east and north through the African Arid Corridor (“AAC”), reaching the semiarid regions of the Mediterranean Basin. In agreement with our biogeographic results, the ancestors of the crown-clade of Geraniaceae (genera *California*, *Erodium* and *Geranium*) may have dispersed from Africa to Eurasia via the Saharo-Arabian deserts and then to North America. Most species of *Erodium* and the oldest clades of *Geranium* established in the Mediterranean area. The central position of the semiarid Mediterranean Basin, with its mountain ranges and seasonal climatic oscillations (especially in cooler periods) could have favoured the adaptation and colonisation of cooler biomes of Eurasia and America by *Geranium* species. Changes in fruit type could have facilitated the colonisation of Mediterranean environments, but also of other habitats, as it is suggested by the diversification and dispersion of Geraniaceae in almost all the world.

1. Introduction

The Mediterranean biomes are geographically separated on different continents, but are characterized by similar climatic conditions of temperate climate, dry summers, and wet winters. The whole Mediterranean region constitutes a global refuge for relict plants and an area that favoured floristic exchange and speciation, but also extinction, local differentiation and migration (Vargas, 2003; Cowling *et al.*, 1996; Thompson, 1999, 2005; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2010). The five Mediterranean-type ecosystems of the world (the Mediterranean Basin, central Chile, the Cape region of South Africa, south-western and southern Australia, and southern California and northern Baja California) are exceptionally rich both in species number and endemism, containing about 20% of the known vascular plant species (almost 50,000) in an area that covers less than 5% of the earth's surface (Cowling *et al.*, 1996). The Mediterranean Basin is the richest of these regions, with c. 25,000 native species, followed by the Cape with 9,000. However, the Cape is consistently the most diverse in relation to the area (Rundel *et al.*, 2016). Some differences exist among these five Mediterranean regions: Central Chile, California and the Mediterranean Basin suffered relatively recent (Late Miocene, Early Pliocene) orogenic events (Thrower & Bradbury 1973), in contrast, the Cape region and south-western Australia were nearly stable. Furthermore, temperature and moisture oscillations associated with Pleistocene glaciations were thought to be more severe in North America, South America, and Europe, compared to Australia and South Africa (Markgraf *et al.*, 1995; Farmer & Cook, 2013). Therefore, these differences may have affected the diversification dynamics (i.e., speciation and extinction rates) of the clades evolving in these areas.

The processes that resulted in a high accumulation of diversity and sometimes a high dispersal rate into these Mediterranean ecosystems remain enigmatic. The role of the Mediterranean Basin as a refuge, thanks to the climatic stability in specific areas of this region (Haffer, 1982; Fjeldså & Lovett, 1997), likely contributed to the survival of species during intervals of global unfavourable climate conditions (i.e. glacial and dry stages). Moreover, several studies have reported rapid radiations in the Cape and the Mediterranean Basin in groups such as *Alchemilla* (Gehrke *et al.*, 2016), Apiaceae (Calviño *et al.*, 2016), *Asparagus* (Norup *et al.*, 2015), Colchicaceae (Hoyo *et al.*, 2009), *Erica* (Pirie *et al.*, 2016),

Hyacinthaceae (Ali *et al.*, 2012; Buerki *et al.*, 2012), Rhamnaceae (Onstein *et al.*, 2015), and *Salvia* (Will & Claßen-Bockhoff, 2014) (Table S1).

The family Geraniaceae Juss. presents a worldwide distribution, but it is better represented in two Mediterranean-type biomes: the Mediterranean Basin and the Cape. In fact, four of its five genera are centred in these regions: *Pelargonium* L'Her. ex Aiton (c. 270 species) and *Monsonia* L. (39 species), distributed in the Cape and parts of the rest of Africa, and *Erodium* L'Her. ex Aiton (c. 74 species), which shows its greatest diversity in the Mediterranean Basin. The monospecific genus *California* Aldasoro *et al.* inhabits the semi-arid region of northwest America; finally, *Geranium* L. –the largest genus of the family with c. 420 species– includes some basal clades spread in the Mediterranean Basin although its core occurs over temperate or even cold areas (Marcussen & Meseguer, 2017, Fig. 1).

Recent studies point to diversification events during the Late Miocene to Pliocene for the four large genera of Geraniaceae (Palazzesi *et al.*, 2012; Sytsma *et al.*, 2014). The putative causes of these diversification and colonisation processes could be the increasing aridity in Africa and the recurrent dispersals into other climates (Fiz *et al.*, 2008; Fiz-Palacios *et al.*, 2010). Between 30 and 75 Ma, much of Africa was occupied by lowland rainforest very similar to those of present-day west central Africa, an inappropriate environment for the Geraniaceae (Axelrod & Raven, 1978). Aridification in southwestern Africa started during early Oligocene, c. 34 Ma (Van Zinderen Bakker, 1975; DeConto & Pollard, 2003; Diekmann *et al.*, 2004), greatly expanding to the rest of the continent during the early Miocene, largely as a result of the uplift of the continent and the further development of the Rift Valley in East Africa (Baker *et al.*, 1972; Axelrod & Raven, 1978). The ancestors of Geraniaceae could have benefited of these aridification processes in Africa to spread and colonise the north of the continent.

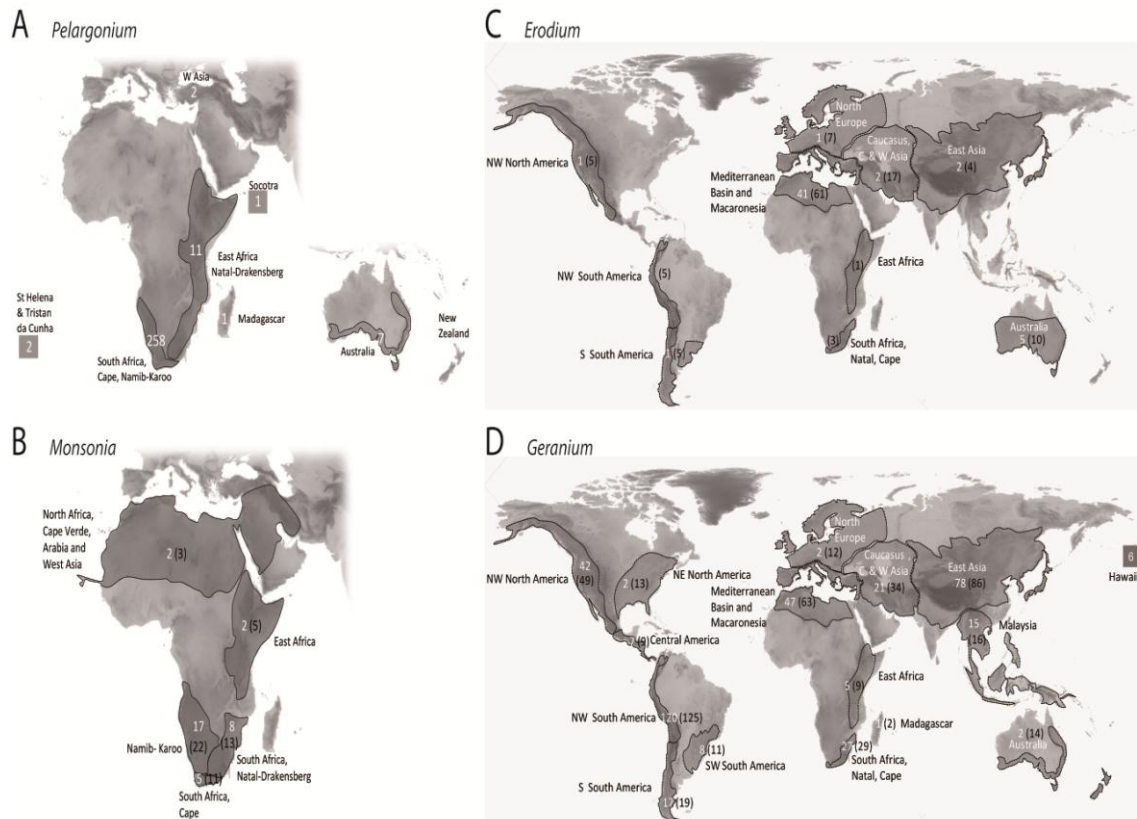


Figure 1. Maps showing the distribution of Geraniaceae genera: A) *Pelargonium*, B) *Monsonia*, C) *Erodium*, D) *Geranium*. White numbers indicate the number of endemic species, while black numbers in brackets are the total number of species in each region.

From the morphological point of view, the family shows remarkable differentiation in habit and fruit diversity. Most Geraniaceae species are perennial herbs, some groups present annuals and, at least one clade of *Pelargonium* and another of *Monsonia* present succulent taxa. The specialized mericarps of many Geraniaceae species seem to be particularly suited to long distance dispersal (Fiz *et al.*, 2006; 2008; Fiz-Palacios *et al.*, 2010). The main fruit type of *Pelargonium* and most *Monsonia* species is the plumose (anemochorous) mericarp, while *California*, *Erodium*, *Geranium* and some *Monsonia* species usually present trypanocarpic fruits. However, some representatives of *California*, *Erodium*, *Geranium* and *Monsonia* exhibit other low-frequency dispersal means, such as mirmecochory and endozoochory (Table S2). Most Geraniaceae (*California*, *Erodium*, *Geranium* and *Monsonia*) present a combination of several dispersion syndromes (anemochorous, carpel projection or seed ejection) followed by secondary hygroscopic burial (trypanocarpic) (Table S2; Stamp, 1989a; b; Van Oudtshoorn & Van Rooyen, 1999). In the last one, due to humidity changes, the mericarps can

move extending and contracting their awn until they become buried on the ground (Table S2; Cobelli, 1892; Stamp, 1984; 1989a; 1989b). The type of fruit dispersal and other reproductive features of the Geraniaceae are only fully known for *Pelargonium*, contrasting with the little knowledge of the other genera.

The aims of the present work were: i) to determine and date the phylogenetic relationships, biogeographic history and diversification rates of Geraniaceae in order to disentangle the ways in which the current geographic distributions of its members came about, ii) examine the role of the fruit type in the colonisation events of Geraniaceae, and iii) unravel how these groups reached and adapted to Mediterranean environments, and later adapted to and colonise other biomes.

2. Materials and Methods

2.1. Study group and taxon sampling

In order to clarify the phylogenetic relationships within Geraniaceae, we obtained sequences for 368 species of this family (Table S3). We also included in the study two representatives of the sister family Hypseocharitaceae (*Hypseocharis bilobata* and *H. pimpinellifolia*) as outgroup species (Fiz *et al.*, 2008; Palazzesi *et al.*, 2012; Sytsma *et al.*, 2014). We compiled information of habit and fruit type for all those Geraniaceae species and outgroup from various sources: published studies, herbarium specimens and our own fieldwork.

2.2. DNA sequencing

Total DNA was extracted from silica gel-dried plant tissue or herbarium material using the “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN Inc., California, USA) according to manufacturer’s instructions. Two variable cpDNA regions were sequenced: *rbcL*^{1F}-*rbcL*^{724R}, and *trnL*^{UAA}-*trnF*^{GAA} (with *trnC* and *trnF* primers; Taberlet *et al.*, 1991), producing a total of 79 new sequences of *rbcL* and 69 of *trnL*-F (Table S3). We also sequenced the nuclear ribosomal marker ITS, which was amplified with the primer pairs ITS1A-ITS4 (White *et al.*, 1990) producing a total of 79 new sequences. We added in this study 247 sequences of the nuclear marker ITS, 260 sequences of the plastid marker *rbcL*, and 306 of the plastid *trnL*-F region available in GenBank. Voucher information and GenBank accession numbers for taxa used in

this study are detailed in Table S3. DNA amplification was performed in an Eppendorf Master-cycler Eppgradient S (Westbury, NY). Amplified products were treated with ExoSAP-IT (USB Corporation, Ohio) and submitted to Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) for sequencing. The sequences of each region were aligned with MAFFT v. 5 (Kato *et al.*, 2005) and checked by eye.

2.3. Phylogenetic inference, molecular dating, diversification analyses and biogeographic inference

Phylogenetic inference and molecular dating were conducted with BEAST v. 1.7.5. (Drummond & Rambaut, 2007). Phylogenetic analyses were performed both on separate datasets for each region and on a concatenated dataset comprising all the sequenced regions. jModelTest v. 2.2 (Posada, 2008) was used to determine the best-fitting model of sequence evolution using the Akaike Information Criteria (AIC), which was GTR + Γ for plastid dataset and GTR for ITS. These two groups of markers were treated as partitions and the substitution and clock models unlinked in the BEAST analyses. Based on the dating analyses of Sytsma *et al.* (2014), we used two secondary age constraints to calibrate the split between *Hypseocharis* and the rest of the ingroup (the root node), and the split between *Pelargonium* and *Monsonia*, using normal prior distributions representing the mean and credible intervals (48 ± 2.5 Ma, and 36 ± 3.0 Ma, respectively) to account for the uncertainty in the original estimates. We conducted four runs of 5×10^7 generations each, sampling every 1000th generation. The resulting posterior distributions were checked using Tracer v. 1.4.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Four analyses were combined using LogCombiner v. 1.4.8, and the maximum credibility trees (MCC) from the BEAST analysis were calculated using Tree Annotator v. 1.6 after removing a burn-in of 20%. Lineage divergence times estimated using the concatenated plastid-nuclear dataset were calculated allowing different substitution models for ITS and cpDNA. Other settings included the lognormal uncorrelated rate prior (UCLN) as clock model and Birth-Death model as tree prior, with a random starting tree.

Spatio-temporal evolution was inferred using the Dispersal–Extinction–Cladogenesis model (DEC) implemented in the R package *BioGeoBEARS* (Matzke, 2014), which was the best fitting model according to Akaike Information criterion

(AIC). The analysis was performed with the MCC tree obtained from BEAST after removing the outgroup species using the function *drop.tip* in the R package *ape* (Popescu *et al.*, 2012). We defined seven geographic areas as operational units, based on our knowledge of the biology and geographic distribution of Geraniaceae: (1) Africa, (2) Mediterranean Basin, (3) Europe, (4) Asia, (5) North America and Hawaii, (6) South America, and (7) Australia and the Pacific Islands. We set the maximum number of ancestral areas to six, which is the most widespread range for any Geraniaceae species.

We investigated potential diversification rate shifts within this family with the methodological framework implemented in BAMM v. 2.1.6 (Bayesian Analysis of Macroevolutionary Mixtures; Rabosky, 2014). We accounted for incomplete sampling in our dataset by detailing a general percentage of missing taxa of 0.5. Our input tree was the chronogram generated from BEAST. BAMM does not account for phylogenetic uncertainty, but in our input tree relationships for the main clades are well supported.

2.4. Ancestral state reconstruction analyses

The evolution of habit was mapped onto the maximum clade credibility tree inferred on BEAST, using maximum likelihood (ML) in Mesquite v. 2.0 (Maddison & Maddison, 2007). ML reconstructions were performed under a single-rate Markov (Mk) likelihood model for discrete morphological characters as described by Lewis (2001). We performed the same type of analysis to estimate the ancestral fruit type of the different genera. We considered five categories for this trait following the classification of Marcussen & Meseguer (2017): 1) anemochorous, 2) trypanocarpic, 3) carpel projection, 4) seed ejection, and 5) inoperative.

3. Results

3.1. Phylogeny, diversification analyses and biogeographic reconstructions

The MCC trees of Geraniaceae included 370 taxa in our analysis: 1 *California*, 62 *Erodium*, 111 *Geranium*, 2 *Hypseocharis*, 32 *Monsonia* and 162 *Pelargonium* species. The resulting phylogenetic analyses of the Geraniaceae revealed congruence amongst the plastid and the nuclear compartments (data not shown), so only the results based on the concatenated dataset are presented here.

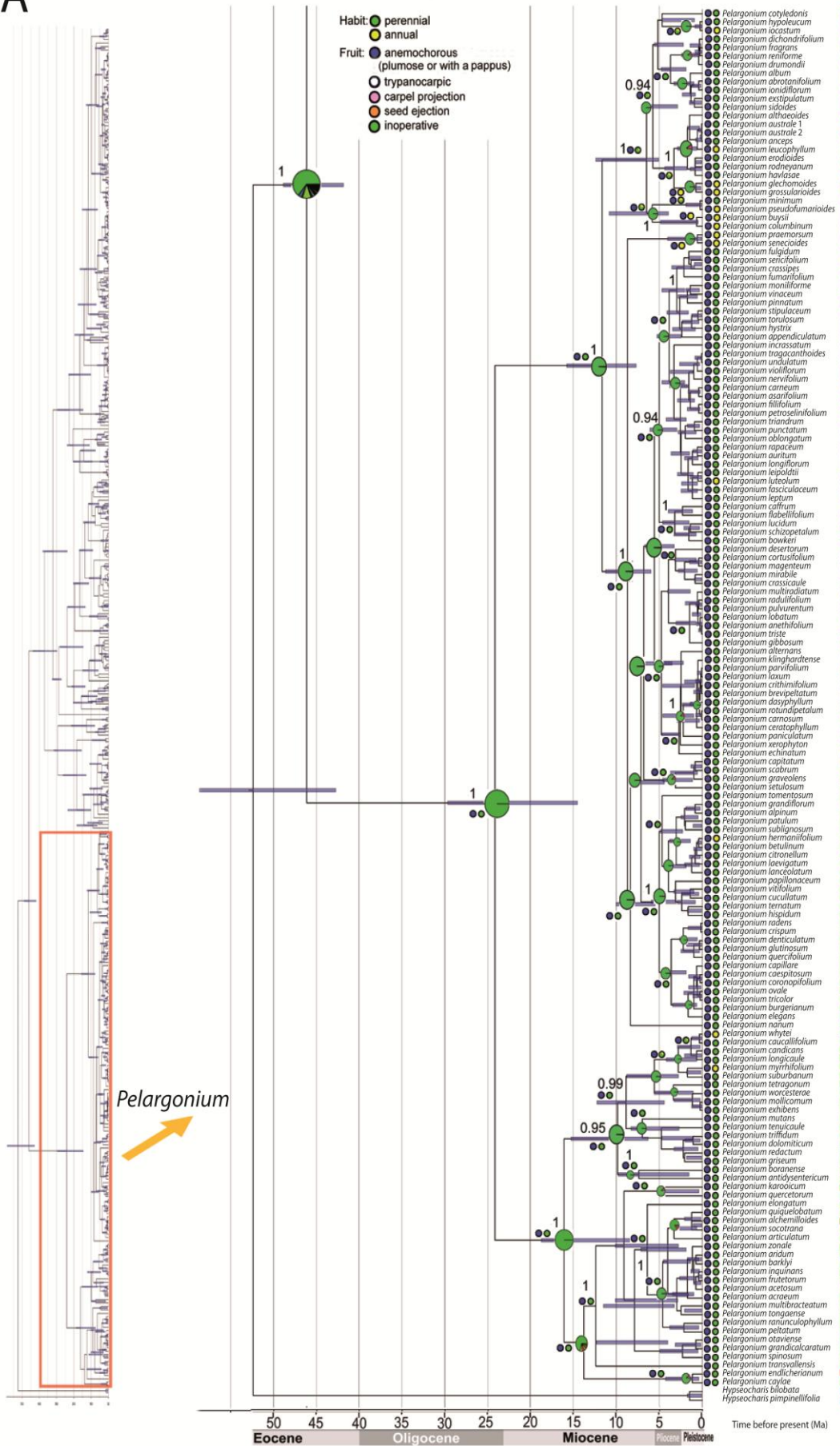
All the genera are monophyletic with statistical support (PP>0.95). The genus *Pelargonium* was found to be the sister group of the remaining genera of Geraniaceae s.str., from which it separated c. 45 Ma (Fig. 2A). According to DEC analysis, the ancestor of the two basal-most subclades in Geraniaceae, i.e. *Pelargonium* and *Monsonia*, occurred in Africa.

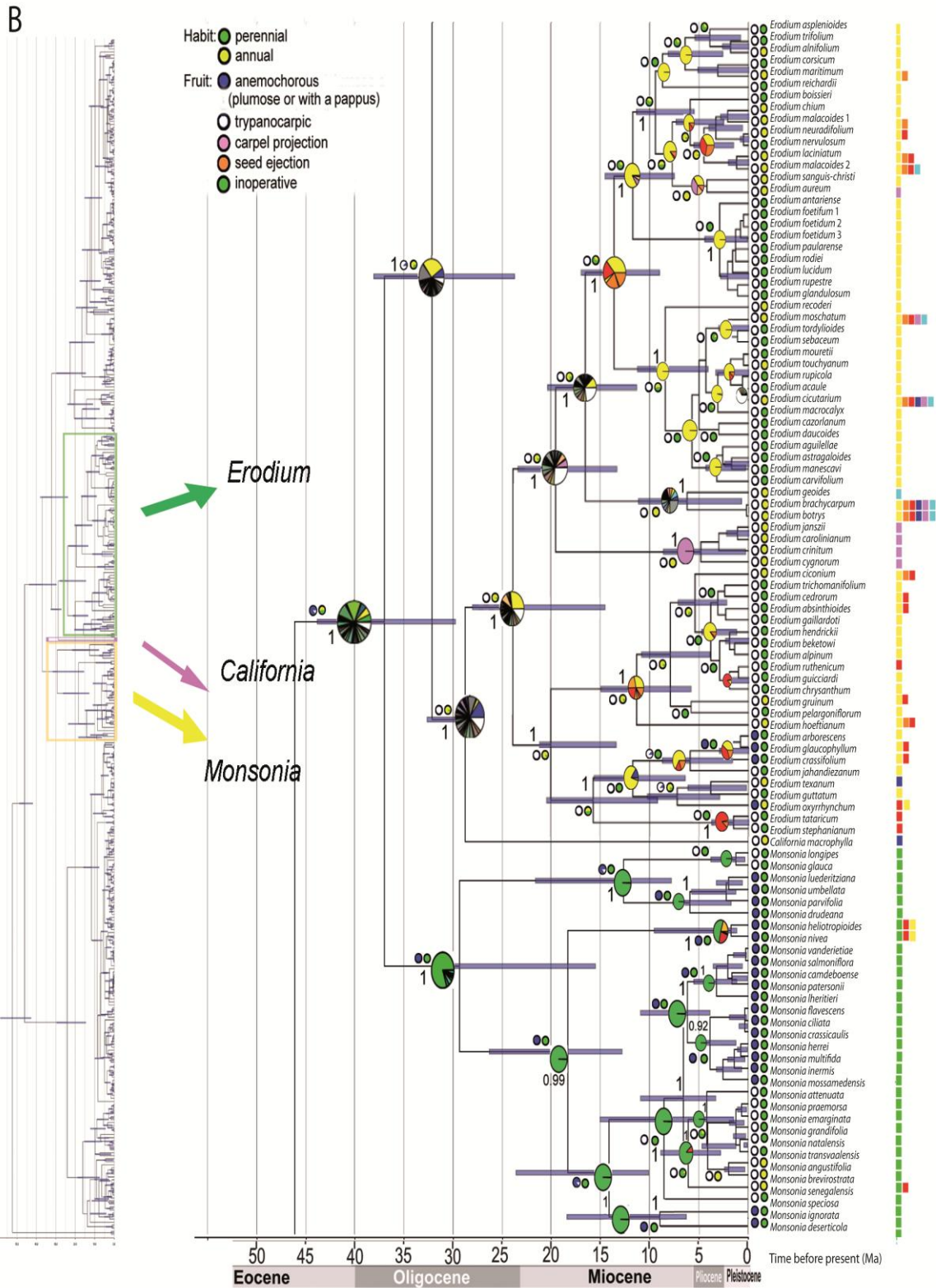
The most probable area for the ancestor of *Monsonia* was Africa. The ancestors of the crown-clade of Geraniaceae related to *Monsonia* and *Pelargonium* dispersed from Africa to Eurasia via the Mediterranean Basin or the Arabian deserts and later to North America. The oldest nodes of *Erodium* were assigned to the Mediterranean Basin-Asia, except for one which was assigned to Australia plus the Mediterranean Basin-Asia. Thus, the DEC analysis suggests that the origin and early diversification of the crown-clade of Geraniaceae occurred in the Mediterranean region, though with high uncertainty for the root node. The oldest lineages of *Erodium* were assigned to the Mediterranean Basin-Asia, except for one which was assigned to Asia and another to Australia plus the Mediterranean Basin-Asia. Moreover, the genus *Erodium* suffered two recent colonisations of North and South America (Fig. 2B).

The phylogenetic results found in the genus *Geranium* show that many of the older nodes were assigned to large combinations of areas, though the origin is likely the Mediterranean Basin plus Asia, as one of both regions received higher probabilities (Fig. 2C). Nevertheless, we only sequenced one species of the Asian sect. *Polyantha* (e.g. *G. strictipes*), deeply separated from the core of subg. *Robertium*. Furthermore, the section *Trilopha* shows an extensive distribution, covering from eastern Africa, to Arabia and Asia (Fig. 2C, group 1). Later in the phylogenetic tree, the basal to middle nodes were assigned to combinations of areas suggesting an extensive colonisation of the Mediterranean Basin and Macaronesia (sects. *Ruberta*, *Anemonifolia*, *Unguiculata*, *Tuberosa*, *Mediterranea*, *Subacaulia*, and *Erodioidea*, Fig. 2C, groups 2–3). However, the sections *Batrachioidea*, *Divaricata* and *Dissecta*, although mostly centred in the Mediterranean, spread in large combinations of areas (Fig. 2C, groups 4–6 and 10). Finally, the large core of *Geranium* subg. *Geranium* was divided into two main subclades, one centred in America and the other in Africa, Eurasia and Australia. Both subclades separated c. 7.5 Ma and diversified in the late Miocene-Pliocene

(Fig. 2C, groups 7 and 8). The American clade is integrated by high mountain species mostly distributed in the Andes mountains, and the Asian species are distributed both in mountains and temperate habitats of the Himalayas and the eastern part of the continent. These two clades are responsible of the two most important diversification shifts occurred in Geraniaceae, which led to c. 120 species in the Andes and c. 84 species in eastern Asia (Fig. 2C).

A





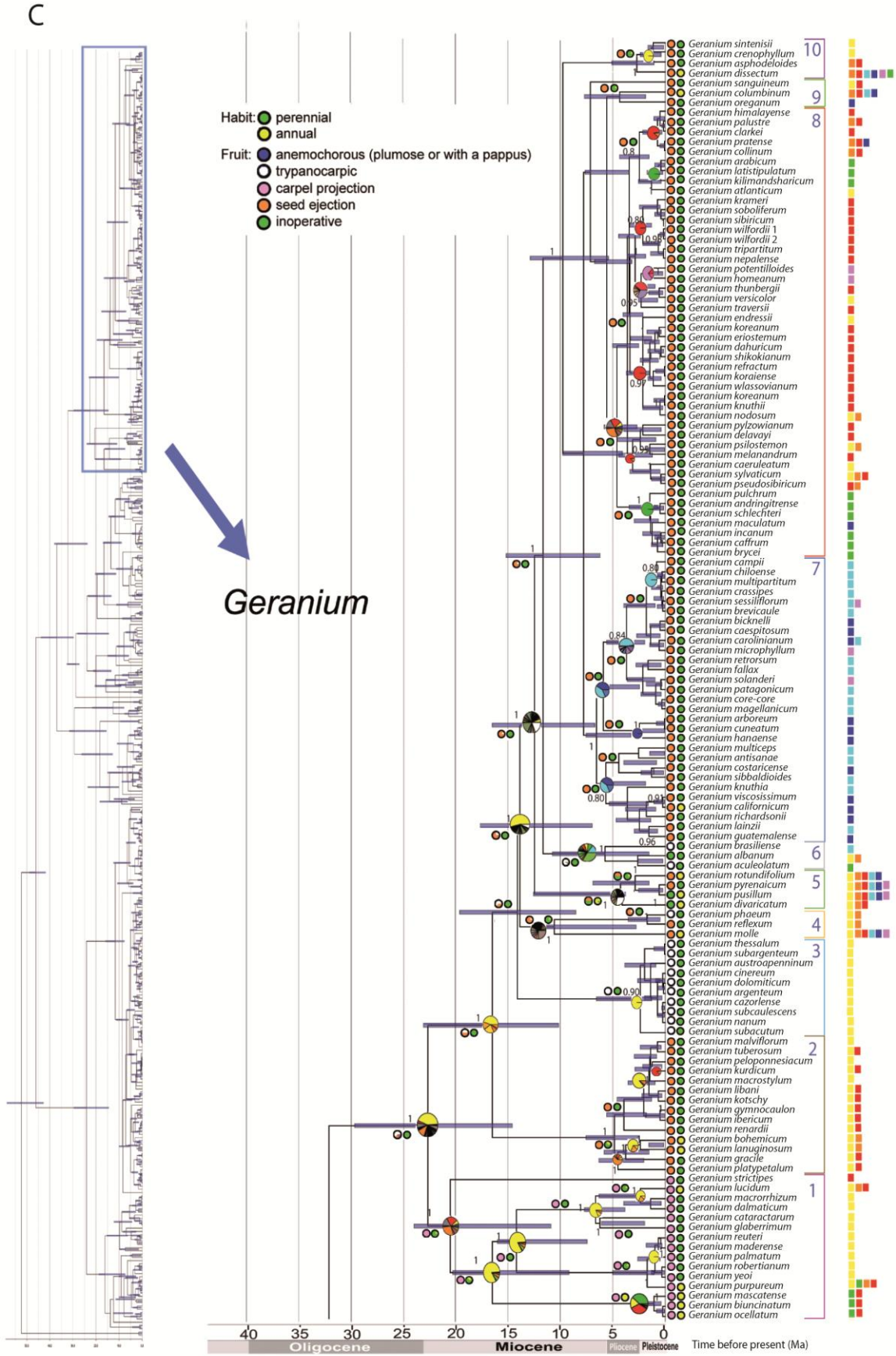


Figure 2. Maximum clade credibility (MCC) tree from the BEAST analysis of plastid and nuclear markers of Geraniaceae, showing the *Pelargonium* clade (A); the *Monsonia*, *California* and *Erodium* clade (B); and the *Geranium* clade (C). Ancestral areas are reconstructed applying the Dispersal-Extinction-Cladogenesis model (DEC). The areas are indicated with colour squares: (1) green: Africa, (2) yellow: Mediterranean Basin, (3) orange: Europe, (4) red: Asia, (5) dark blue: North America and Hawaii, (6) light blue: South America, (7) purple: Australia and the Pacific Islands. The small pies next to the nodes and species names represent the maximum likelihood reconstruction for the habit (right) and the fruit types (left). See colour legend for more details.

BAMM analysis showed two significant diversification rate shifts in Geraniaceae. Both shifts correspond to an increase of the diversification rate during the Miocene, one within the genus *Pelargonium*, and the other one on the origins of the crown clade of *Geranium* (Fig. 3).

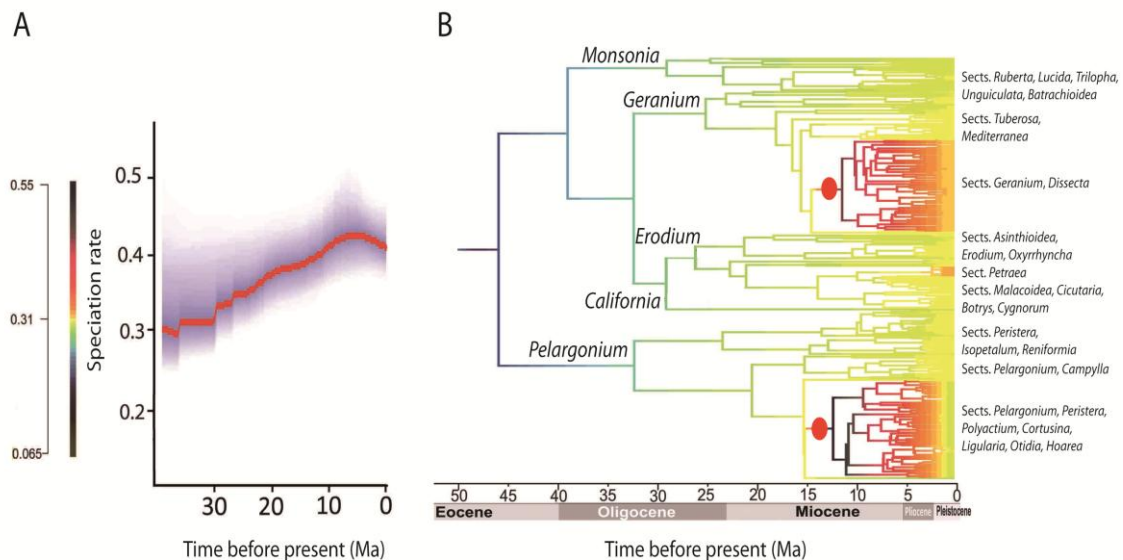


Figure 3. (A) Diversification rate through time and (B), BAMM phylorate plot showing changes in net diversification rates across branches on the MCC tree. The red circle indicates a significant diversification rate shift.

3.2. Changes in habit type and dispersal mode.

We identified five types of fruit within Geraniaceae (anemochorous, trypanocarpic, carpel projection, seed ejection, inoperative). The ancestor of the family is reconstructed as an anemochorous species (Fig. 2A). All *Pelargonium* species present anemochorous fruits: they have plumose mericarps which sometimes carry a pappus. Two main diaspore types are identifiable in *Monsonia*: anemochorous and trypanocarpic mericarps. Most species of *Monsonia* present anemochorous mericarps, while the trypanocarpic fruit type appeared in two

independent lineages. *California* presents trypanocarpic mericarps and almost all *Erodium* species exhibit trypanocarpic fruits, even there are few species with anemochorous mericarps (Fig. 2B). Finally, three main fruit types are found in *Geranium*, but the majority of species present the mericarp (seed ejection type of fruit) thrown ballistically, moving away from the original plant (Sects. *Anemoniifolia*, *Batrachioidea*, *Lucida*, *Polyantha*, *Unguiculata*, and some species of the Sects. *Ruberta* and *Trilopha*). The other two fruit types in this genus are grouped in one clade: species in which the seed is the only part thrown ballistically from the open carpel (carpel projection), and species in which the mericarp or the mericarp body remains in the fruit, and the throwing mechanism is inoperative (Fig. 2C).

The ancestor of Geraniaceae was reconstructed as a perennial species (Fig. 2A). Our results inferred several transitions in life form occurring recurrently during the evolution of the family. Changes in habit can be observed in *Pelargonium* where some clades present annual species, but most of them are perennial. Most of the ancestral nodes of the genus *Monsonia* were reconstructed as perennial, although there is a clade comprising annual species. The genus with more annual species in the family is *Erodium*, with many of its clades comprising short-lived species. The largest genus, *Geranium*, presents most of its species as perennial and few transitions from perennial to annual life form in different clades (Fig. 2C).

4. Discussion

4.1. Diversification and biogeographic history of Geraniaceae

Our phylogenetic analyses using two species of *Hypseocharis* as outgroup produced age estimates for the five genera clades similar to those obtained by Fiz *et al.* (2008) and Sytsma *et al.* (2014). The genus *Pelargonium* was found to be the sister group of the remaining genera of Geraniaceae s.str., a result first indicated by Price & Palmer (1993). *Pelargonium* presents an early separation into two groups of species (species with small and large chromosomes, Bakker *et al.* 2004). The highest diversification rate of this genus occurred during the upper Miocene (10–15 Ma) in South Africa, likely in relation to coevolution with specialized pollinators (Bakker *et al.*, 2004).

According to the biogeographic analysis, the separation of the basal-most genera *Pelargonium* and *Monsonia* occurred in Africa during the middle Eocene (45.5 Ma, 42–48.1 Ma). *Monsonia* started to diverge in Africa during the Oligocene (c. 21 Ma), with a low diversification rate (Fig. 3). The ancestors of the remaining genera (*California*, *Erodium* and *Geranium*), which constitute the crown-clade of Geraniaceae, could have dispersed from southern Africa to Eurasia via the Saharo-Arabian deserts and later to North America (Figs. 2B & 2C; Van Zinderen Bakker, 1969). Given the position of the genus *California* in the phylogenetic tree, two hypotheses could explain the current distribution of *California*: the ancestor could have dispersed from North Africa to Asia; or it could have dispersed to Europe, and then to Northeast America (Fig. 4; Lavin *et al.*, 2000). The ambiguous ancestral biogeographic reconstructions obtained for the crown-clade of Geraniaceae (with numerous different combinations equally possible and including a large number of areas) is in agreement with the great capacity to disperse and colonise new habitats by these groups, mainly across the northern hemisphere (Figs. 2B & 2C).

The genus *Erodium* presents species in all continents, but a major centre of diversity is observed in the Mediterranean Basin (62 species), whereas other continents harbour a few native species (Fig. 1). Most nodes of *Erodium* were assigned to the Mediterranean Basin and regions of Eurasia, and just one clade to Australia (Fig. 2B). These results suggest that the arrival to Australia was linked to a unique long-distance dispersal event. Several dispersal events to America took place in this genus during the Miocene, most likely from the Mediterranean Basin (Fig. 2B). Concerning *Geranium*, the oldest clades of this genus are also distributed in the Mediterranean Basin, from where some ancestors dispersed to all continents except the Antarctica. It is important to highlight that the largest diversification of Geraniaceae occurred within this genus in the Mediterranean Basin during the later Miocene (5.3–11.6 Ma). Past climatic changes and orogenic activity in this area could have favoured the adaptation to high and cold environments in some lineages of *Erodium* and *Geranium* (Figs. 2B & 2C).

Some *Erodium*, *Geranium* and *Pelargonium* species dispersed to Australia. Our reconstructions indicate that several long-distance dispersal events to this continent occurred from Africa, the Mediterranean Basin, South America and West Asia (Fig. 2C). According to our estimates, this occurred in Eurasia and the

Mediterranean Basin during the latter part of the Miocene or the Pliocene (Fiz *et al.*, 2008). Other long-distance dispersal events have been described for other plant families between the northern hemisphere and Australia (*Ceratocephala*, Garnock-Jones, 1984; *Scleranthus*, Smitsen, 2003). Finally, several long-distance dispersal events between North and South America occurred in *Geranium* during the Miocene-Pliocene boundary (3.1–7.5 Ma), highlighting the colonisation abilities of these species.

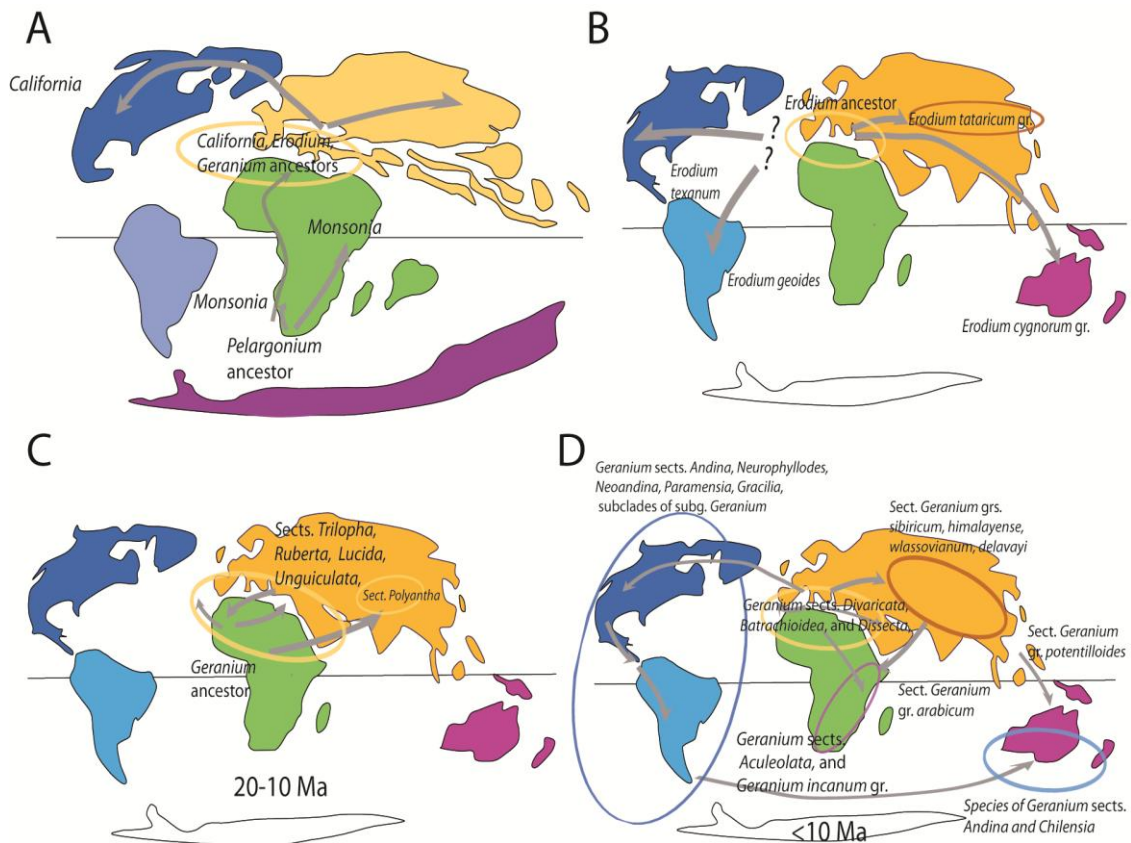


Figure 4. A) Biogeography of Geraniaceae and possible colonisations during the Oligocene, deduced from DEC analysis. B) Miocene-Pliocene biogeography and colonisations of *Erodium* lineages considering all subgeneric groups. C) Biogeography and colonisations of *Geranium* lineages in the Early Miocene (c. 10–20 Ma). D) Biogeography and colonisations of *Geranium* lineages in the Late Miocene-Pliocene (<10 Ma)

4.2. Colonisation and adaptation to different biomes thanks to key innovations

The fruit type likely played an important role in the colonisation and settlement of Geraniaceae to a broad variety of habitats. Nearly all species of *Pelargonium* and *Monsonia* are anemochorous, while *Monsonia* species inhabiting grasslands and savannahs produce trypanocarpic mericarps. The changes in the dispersal mode of *Monsonia* were often in the same direction: from anemochorous

in arid or hyper-arid biomes to trypanocarpic in wetter ones and viceversa. Furthermore, most *Pelargonium* and *Monsonia* species are drought-tolerant; and stem and leaf succulence likely constituted key-innovations, which evolved independently at least twice, in the section *Subsucculentia* of *Pelargonium* (Bakker *et al.*, 2004) and in *Monsonia* subg. *Sarcocaulon* (Touloumenidou *et al.*, 2007). The specialised adaptation of *Pelargonium* to the Cape region has been explained by several key innovations, such as acquisition of stem succulence, tubers, and flower modifications to attract long-tongued pollinators, which likely triggered the rapid radiation of the genus (Bakker *et al.*, 2004). The evolution of flowers within this genus is key to understand the quick diversification of *Pelargonium*, triggered by the activity of some groups of South African insects, which are able to extract the nectar from different types of nectaries (Blank, 2014).

California shows several intermediate features between *Erodium* and *Geranium* (Aldasoro *et al.*, 2002). Most basal nodes of *Erodium* and *Geranium* were assigned to different areas and seem to be fairly invasive species (Figs. 2B & 2C). This feature may be associated to the short-lived habit, high autogamy or to high dispersability of their fruits. Apparently, only key changes in the habit (annual versus perennial) and the fruit (trypanocarpic versus anemochorous) may have influenced their dispersal ability. *Erodium* and some groups of *Geranium* include a high proportion of taxa adapted to disturbed habitats with higher colonising abilities, frequent annuals and selfers, with trypanocarpic mericarps. In contrast, most Eurasian or American species of *Geranium* subg. *Geranium* present seed ejection type of dispersal system (Yeo, 1984; Marcussen & Meseguer, 2017).

The different mechanisms of dispersion of Geraniaceae were studied by Yeo (1984), although this author focused mainly on the genus *Geranium*. Anemochorous telechory (adaptation to long range dispersal) is often found in deserts, while in other habitats the means of dispersal are considerably more complex (Van Oudtshoorn & Van Rooyen, 1999). The dispersal strategy in Geraniaceae varies according to species and habitats: most species of *Pelargonium*, some *Monsonia*, and three species of *Erodium* are anemochorous, *California*, and the other species of *Erodium* and *Monsonia*, are autochorous or have a combination of zoochory and autochory, and, finally, the majority of *Geranium* species are autochorous (ballistic). *California*, most *Erodium* and some *Monsonia* and *Geranium*

(Sect. *Subacaulia*) exhibit a combination of primary ballistic dispersion followed by secondary hygroscopic burying. Trypanocarpic burying was demonstrated as highly advantageous in semiarid habitats (García-Fayos *et al.*, 2013) while telochory (by wind or other systems) is advantageous in deserts and autochory occurs generally in temperate and productive ecosystems (Van Oudtshoorn & Van Rooyen, 1999).

5. Conclusions

The early Geraniaceae were likely well adapted to arid and semiarid habitats of Africa. The split of the five Geraniaceae genera may have occurred in the Oligocene, though their diversification occurred during the Miocene, coinciding with the beginning of the major aridifications in Africa. Some species of *Pelargonium* are adapted to the Mediterranean climate in the Cape, while other are distributed in the arid South African habitats. *Monsonia* appeared in South Africa and colonised the Southwestern African deserts while some groups of species dispersed to the north and east through the African Arid Corridor. The ancestors of the crown-clade of Geraniaceae may have dispersed from Africa to Eurasia via the Saharo-Arabian deserts and then to North America, as can be deduced from the *California* distribution. *Erodium*, mainly distributed in the Mediterranean Basin, dispersed several times from North Africa to Europe and Asia, and also to North America. The orogenic and climatic changes in the Mediterranean Basin likely favoured some groups of *Erodium* and *Geranium* to adapt to cooler environments.

The dispersal strategy in Geraniaceae is often related to the type of habitat: regardless of the phylogenetic position, trypanocarpic fruits are found in species adapted to temperate and Mediterranean habitats, plumose anemochorous ones are common in arid and hiperarid species, and species distributed in cold and temperate regions present autochorous-ballistic mericarps. All of them seem sufficiently effective to allow dispersal among continents.

References

- Aldasoro, J. J., Navarro, C., Vargas, P., Sáez, L., & Aedo, C. (2002) *California*, a new genus of Geraniaceae endemic to the southwest of North America. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **59**, 209–216.
- Ali, S. S. *et al.* (2013) Out of Africa: Miocene dispersal, vicariance, and extinction within Hyacinthaceae subfamily Urgineoideae. *Journal of Integrative Plant Biology*, **55**, 950–964.
- Axelrod, D. I. & Raven, P. H. (1978) Late Cretaceous and Tertiary vegetation history of Africa. *Biogeography and Ecology of Southern Africa*, **31**, 77–130.
- Baker, B. H., Mohr, P. A. & Williams, L. A. J. (1972) Geology of the eastern rift system of Africa. *Geological Society of America Special Papers*, **136**, 1–68.
- Bakker, F. T., Culham, A., de Marais, A. B. & Gibby, M. (2005). Nested radiation in Cape *Pelargonium*. In F.T. Bakker (Ed.). *Plant species-level systematics: new perspectives on pattern & process* (pp. 75-100). A.R.G. Gantner Verlag: Liechtenstein.
- Blank, E. M. (2014) *Pelargonium* (Geraniaceae) and the long-tongued fly pollination guild: coevolution and polymorphism in a specialized pollination system. *University of Connecticut*, PhD thesis.
- Buerki, S. *et al.* (2012) Contrasting biogeographic and diversification patterns in two Mediterranean-type ecosystems. *PLoS One*, **7**, e39377.
- Calviño, C. I., Teruel, F. E. & Downie, S. R. (2016) The role of the Southern Hemisphere in the evolutionary history of Apiaceae, a mostly north temperate plant family. *Journal of Biogeography*, **43**, 398–409.
- Cobelli, T. (1892) I Movimenti del fiore e del frutto dell'*Erodium gruinum*. *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, **24**, 59–64.
- Cowling, R. M., Rundel, P. W., Lamont, B. B., Arroyo, M. K. & Arianoutsou, M. (1996) Plant diversity in Mediterranean-climate regions. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 362–366.
- DeConto, R. M. & Pollard, D. (2003) Rapid Cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO₂. *Nature*, **421**, 245–249.
- Diekmann, B., Kuhn, G., Gersonde, R. & Mackensen, A. (2004) Middle Eocene to early Miocene environmental changes in the sub-Antarctic Southern Ocean:

- evidence from biogenic and terrigenous depositional patterns at ODP Site 1090. *Global and Planetary Change*, **40**, 295–313.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Farmer, G. T. & Cook, J. (2013) Pleistocene glaciations. *Climate Change Science: A Modern Synthesis*, **1**, 407–427.
- Fiz, O., Vargas, P., Alarcón, M. L. & Aldasoro, J. J. (2006) Phylogenetic relationships and evolution in *Erodium* (Geraniaceae) based on trnL-trnF sequences. *Systematic Botany*, **31**, 739–763.
- Fiz, O. *et al.* (2008) Phylogeny and historical biogeography of Geraniaceae in relation to climate changes and pollination ecology. *Systematic Botany*, **33**, 326–342.
- Fiz-Palacios, O., Vargas, P., Vila, R., Papadopulos, A. S. & Aldasoro, J. J. (2010) The uneven phylogeny and biogeography of *Erodium* (Geraniaceae): radiations in the Mediterranean and recent recurrent intercontinental colonization. *Annals of Botany*, **106**, 871–884.
- Fjeldså, J. & Lovett, J. (1997) Geographical patterns of phylogenetic relicts and phylogenetically subordinate species in tropical African forest. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 325–346.
- García-Fayos, P., Engelbrecht, M., & Bochet, E. (2013) Post-dispersal seed anchorage to soil in semiarid plant communities, a test of the hypothesis of Ellner and Shmida. *Plant Ecology*, **214**, 941–952.
- Garnock-Jones, P. J. (1984) *Ceratocephalus pungens* (Ranunculaceae): a new species from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, **22**, 135–137.
- García-Fayos, P., Engelbrecht, M. & Bochet, E. (2013) Post-dispersal seed anchorage to soil in semiarid plant communities, a test of the hypothesis of Ellner and Shmida. *Plant Ecology*, **214**, 941–952.
- Gehrke, B., Kandziora, M. & Pirie, M. D. (2016) The evolution of dwarf shrubs in alpine environments: a case study of *Alchemilla* in Africa. *Annals of Botany*, **117**, 121–131.
- Haffer, J. (1982) General aspects of the refuge theory. *Biological diversification in the tropics*. Prance, GT. Columbia University Press, New York, **714**, 6–24.

- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Hamilton, M. B. (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521–522.
- Hoyo, A., García-Marín, J. L. & Pedrola-Monfort, J. (2009) Temporal and spatial diversification of the African disjunct genus *Androcymbium* (Colchicaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **53**, 848–861.
- Katoh, K., Kuma, K. I., Toh, H. & Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic acids research*, **33**, 511–518.
- Lewis, P. O. (2001) Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 30–37.
- Link, D. A. (1990) The nectaries of Geraniaceae. *Proceedings of the international Geraniaceae Symposium, University Stellenbosch*, **217**, 25.
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B. & Rubel, F. (2006) World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, **15**, 259–263.
- Lavin, M., Thulin, M., Labat, J. N. & Pennington, R. T. (2000) Africa, the odd man out: molecular biogeography of dalbergioid legumes (Fabaceae) suggests otherwise. *Systematic Botany*, **25**, 449–467.
- Maddison, W. & Maddison, D. (2007) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.0. Available at: <http://mesquiteproject.org>.
- Marcussen, T. & Meseguer, A. S. (2017) Species-level phylogeny, fruit evolution and diversification history of *Geranium* (Geraniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **110**, 134–149.
- Markgraf, V., McGlone, M. & Hope, G. (1995) Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems -a southern perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, **10**, 143–147.
- Matzke, N. J. (2014) Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. *Systematic Biology*, **63**, 951–970.

- Norup, M. F. *et al.* (2015) Evolution of *Asparagus* L. (Asparagaceae): out-of-South-Africa and multiple origins of sexual dimorphism. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **92**, 25–44.
- Onstein, R. E., Carter, R. J., Xing, Y., Richardson, J. E. & Linder, H. P. (2015) Do Mediterranean-type ecosystems have a common history? Insights from the Buckthorn family (Rhamnaceae). *Evolution*, **69**, 756–771.
- Palazzesi, L., Gottschling, M., Barreda, V. & Weigend, M. (2012) First Miocene fossils of Vivianiaceae shed new light on phylogeny, divergence times, and historical biogeography of Geraniales. *Biological Journal of the Linnean Society*, **107**, 67–85.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L. & McMahon, T. A. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, **4**, 439–473.
- Pirie, M. D. *et al.* (2016) The biodiversity hotspot as evolutionary hot-bed: spectacular radiation of *Erica* in the Cape Floristic Region. *BMC Evolutionary Biology*, **16**, 190.
- Popescu, A. A., Huber, K. T. & Paradis, E. (2012) *ape* 3.0: New tools for distance-based phylogenetics and evolutionary analysis in R. *Bioinformatics*, **28**, 1536–1537.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.
- Price, R. A. & Palmer, J. D. (1993) Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geraniales from rbcL sequence comparisons. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**, 661–671.
- Rabosky, D. L. (2014) Automatic detection of key innovations, rate shifts, and diversity-dependence on phylogenetic trees. *PloS ONE*, **9**, e89543.
- Rodríguez-Sánchez, F., Hampe, A., Jordano, P. & Arroyo, J. (2010) Past tree range dynamics in the Iberian Peninsula inferred through phylogeography and palaeodistribution modelling: a review. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **162**, 507–521.

- Rundel, P. W. *et al.* (2016) Mediterranean Biomes: Evolution of Their Vegetation, Floras, and Climate. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **47**, 383–407.
- Sanmartín, I. (2003) Dispersal vs. vicariance in the Mediterranean: historical biogeography of the Palearctic *Pachydeminae* (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Journal of Biogeography*, **30**, 1883–1897.
- Smitsen, R. D., Garnock-Jones, P. J. & Chambers, G. K. (2003) Phylogenetic analysis of ITS sequences suggests a Pliocene origin for the bipolar distribution of *Scleranthus* (Caryophyllaceae). *Australian Systematic Botany*, **16**, 301–315.
- Stamp, N. E. (1984) Self-burial behaviour of *Erodium cicutarium* seeds. *The Journal of Ecology*, **72**, 611–620.
- Stamp, N. E. (1989a) Efficacy of explosive vs. hygroscopic seed dispersal by an annual grassland species. *American Journal of Botany*, **76**, 555–561.
- Stamp, N. E. (1989b) Seed dispersal of four sympatric grassland annual species of *Erodium*. *The Journal of Ecology*, **77**, 1005–1020.
- Sytsma, K. J., Spalink, D. & Berger, B. (2014) Calibrated chronograms, fossils, outgroup relationships, and root priors: re-examining the historical biogeography of Geraniales. *Biological Journal of the Linnean Society*, **113**, 29–49.
- 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.
- Thompson, J. D. (1999) Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity*, **82**, 229–236.
- Thompson, J. D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford: Oxford University Press.
- Thrower, N. J. & Bradbury, D. E. (1973) The physiography of the Mediterranean lands with special emphasis on California and Chile. *Mediterranean Type Ecosystems*, **7**, 37–52.
- Touloumenidou, T., Bakker, F. T. & Albers, F. (2007) The phylogeny of *Monsonia* L. (Geraniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **264**, 1–14.

- Van Oudtshoorn, K. V. R. & Van Rooyen, M. W. (1999) *Dispersal Biology of Desert Plants*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Van Zinderen Bakker, E. M. (1975) The origin and palaeoenvironment of the Namib Desert biome. *Journal of Biogeography*, **2**, 65–73.
- Vargas, P. (2003) Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon*, **52**, 463–476.
- Weeks, A. *et al.* (2014) To move or to evolve: contrasting patterns of intercontinental connectivity and climatic niche evolution in “Terebinthaceae” (Anacardiaceae and Burseraceae). *Frontiers in Genetics*, **5**, 409.
- Weng, M. L., Ruhlman, T. A., Gibby, M. & Jansen, R. K. (2012) Phylogeny, rate variation, and genome size evolution of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**, 654–670.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. & Taylor, J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **18**, 315–322.
- Will, M. & Claßen-Bockhoff, R. (2014) Why Africa matters: evolution of Old World *Salvia* (Lamiaceae) in Africa. *Annals of Botany*, **114**, 61–83.
- Yeo, P. F. (1984) Fruit-discharge-type in *Geranium* (Geraniaceae): its use in classification and its evolutionary implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **89**, 1–36.

Supplementary Information

Table S1. Examples of plant groups that include species distributed in the Cape Floristic Region (CFR) and in the Mediterranean Basin (MB), showing the number of species of these lineages, the divergence times, and the colonisation events occurring from the Cape to the Mediterranean Basin (C→M), from the Mediterranean Basin to the Cape (M→C) or dispersals in both directions (C↔M).

Species	Nº of species CFR / MB	Stem age in CFR (Ma)	Stem age in MB (Ma)	Colonisation events	Reference
Apiaceae	37/4	60.9–71.2	10–40	C ↔M	Calviño <i>et al.</i> , 2016
<i>Asparagus</i>	84/18	Not shown	Not shown	C→M	Norup <i>et al.</i> , 2015
Cariophyllaceae: <i>Dianthus</i>	9/121	0.5–1.4	4.7–15.8	M→C	Balao <i>et al.</i> , 2010
Colchicaceae: <i>Androcymbium- Clochicum</i>	32/40	11.9–14.9	5–9	C→M	Hoyo <i>et al.</i> , 2009
Ericaceae: <i>Erica</i>	690/16	6–15.0	Not shown	M→C	Pirie <i>et al.</i> , 2016
Hyacinthaceae	29/8	39–55.7	12.5–32.3	C →M	Ali <i>et al.</i> , 2012
Iridaceae: <i>Gladiolus</i>	106/7	12–27.4	3.1–12.2	C→M	Valente <i>et al.</i> , 2011
Rhamnaceae: <i>Salvia</i>	97/20 23/22	35–20 Not shown	8 Not shown	C ↔M	Onstein <i>et al.</i> , 2015 Will & Claßen- Bockhoff, 2014

Table S2. Data published in the literature about dispersal systems in Geraniaceae. Systems of dispersal and burial: (1) primary system of dispersal; (2) secondary system of dispersal; (3) system of self-burial, asterisk (*) indicates a relationship to human activities.

Type	Dispersal and burial systems	Species: <i>E.</i> = <i>Erodium</i> , <i>G.</i> = <i>Geranium</i> , <i>M.</i> = <i>Monsonia</i>	Geographic area where this form of dispersal was studied	Reference
Anemochory	transported by wind wind (1), hygroscopic (3)	<i>E. oxyrhynchum</i>	Israel, Negev desert	Loria & Noi-Meir, 1980
	wind (1)	<i>E. crassifolium</i>	Israel, Negev desert	Zeide, 1976
Mirmecochory	carried by ants to their nests ants (1), self-burial (3)	<i>E. cicutarium</i>	USA, California	Harmon & Stamp, 1992
Endozoochory	eaten and transported in the digestive tract birds (1) and domestic cattle* (1)	<i>G. molle</i>	UK, Lincolnshire	Ridley, 1930
		<i>E. cygnorum</i>	Australia	Ridley, 1930
		<i>E. cicutarium</i>	USA, NW Coasts	Ridley, 1930
Epizoochory	adhered to artiodactyls *	<i>G. molle, G. pusillum</i>	Sweden	Ridley, 1930
		<i>E. malacoides</i>	Israel, Mediterranean chaparral	Shmida & Ellner, 1983
		<i>E. laciniatum</i> , <i>E. chium</i> <i>E. acaule, E. botrys, E.</i> <i>cicutarium</i>	South Europe	Ridley, 1930
Autochory	ballistic dispersal (1), hygroscopic (3)	<i>M. brevirostrata</i>	South Africa	Ridley, 1930
		<i>E. moschatum</i>	USA, California	Stamp, 1989
Antropochory	transported by man ballast heaps in shipping (1) *	<i>E. cicutarium</i>	USA, Philadelphia;	Ridley, 1930
		<i>G. molle</i>	USA, Alabama	Ridley, 1930

Table S3. Material used in Geraniaceae and outgroup. New sequences are in bold. Asterisk (*) means that the sequence belongs the complete plastid genome. Dashes (-) indicate missing information.

Species	Locality, voucher and herbarium or reference	ITS	<i>rbcl</i>	<i>trnL-F</i>
<i>California macrophylla</i>	U.S.A., California, Riverside Co., Temescal Valley, S of De Palma Ra, Gillespie 10 (MA)	EF185338	DQ452869	DQ072013
<i>Erodium absinthioides</i>	Turkey, Bursa, Uludag, Nieto Feliner 1580 (MA)	EF185348	DQ452876	DQ072034
<i>E. acaule</i>	Italy, Sicilia, Palermo (MA645189)	EF185392	MF150994	DQ072089
<i>E. alnifolium</i>	Tunisia, Nefta, Segename A2865	EF185391	MF150995	DQ072064
<i>E. alpinum</i>	Italy, Abruzzo, Mount Rosa Pinnola, Bisegna, L'Aquila, Conti 1656 (MA)	EF185351	MF150996	DQ072029
<i>E. antariense</i>	Morocco, High Atlas, Tizi-n-Aït-Hamed, Güemes 1549 (MA)	EF185374	DQ452881	DQ072078
<i>E. arborescens</i>	Tunisia, Skhira, Aldasoro 3053 (MA)	EF185341	MF150997	DQ072018
<i>E. asplenioides</i>	Tunisia, La Kesra-Darsole, Timbal s.n. (MPU)	EF185390	MF150998	DQ072065
<i>E. aureum</i>	Australia, Coolgardie, Eyre Higway, 59 Km W of Madura, Archer 15 (MEL2039223)	EF185385	MF150999	DQ072066
<i>E. beketowii</i>	Ukraine, Biespars, Stavropol, Smababanova s.n. (LE)	EF185358	MF151000	DQ072030
<i>E. boissieri</i>	Spain, Granada, Cortijo de Cortichuela, Trevenque, Velayos & Navarro, 9676 (MA)	EF185378	MF151001	DQ072054
<i>E. botrys</i>	U.S.A., California, San Francisco, Mt. Tamalpais, Castroviejo <i>et al.</i> 14575 (MA)	EF185365	MF151002	DQ072049
<i>E. brachycarpum</i>	Spain, Madrid, Rozas de Puerto Real, López 499 (MA)	EF185366	DQ452879	DQ072050
<i>E. cazorlanum</i>	Spain, Jaén, Cazorla, Cortijo de la Cabrilla, Navarro & Benavente, 3025 (MA)	EF185404	MF151003	DQ072097
<i>E. cedrorum</i>	Turkey, Bolkar Daglari, Nigde, A3489 (MA)	MF150914	MF151004	DQ072031
<i>E. chium</i>	Spain, Cádiz, Ronda, Mt. Tavirana, Navarro 3450 (MA)	EF185384	MF151005	DQ072067
<i>E. chrysanthum</i>	Greece, Killini, Gipfel Massif, Hörand & Hadacek, 7612 (W)	EF185361	EU922066	DQ072032
<i>E. ciconium</i>	Italy, Abruzzo, L'Aquila, Santo Stéfano de Sessanio, Aedo <i>et al.</i> 8108 (MA)	EF185355	DQ452875	DQ072039
<i>E. cicutarium</i>	Spain, Salamanca, Fuente de San Esteban, Aedo <i>et al.</i> 4931 (MA)	EF185393	DQ452882	DQ072052
<i>E. corsicum</i>	France, Corsica, Piana, plage di Ficajola, Serra and Bort 4897 (MA623612)	EF185380	MF151006	DQ072059
<i>E. cossonii</i>	Morocco, High Atlas, Tiz-n-Test, Fernández Casas <i>et al.</i> 3277 (MA252363)	EF185388	MF151007	DQ072073
<i>E. crassifolium</i>	Tunisia, Gabes, Coutinedes, A3069	EF185339	KF977221*	KF977221*
<i>E. crinitum</i>	Australia, Buraminy, 10 Km E between Roe and Coolgardie, Archer 27069213	MF150915	DQ452877	DQ452897
<i>E. cygnorum</i>	Cultivated from seeds collected in Great Victoria Desert (Australia), Aldasoro 2842 (MA)	EF185363	DQ452878	DQ072044
<i>E. daucooides</i>	Spain, Jaén, Los Cortijos Nuevos, El Yelmo, Navarro <i>et al.</i> 2307 (MA625205)	EF185402	-	DQ072095
<i>E. foetidum</i> subsp. <i>foetidum</i>	Spain, Girona, Cap Norfeu, Aedo CA4920 (MA)	HQ677605	KJ916490	KF771022*
<i>E. gaillardotti</i>	Turkey, Malatya, Darende, 27 Km from Gürün to Darende, Muñoz-Garmendia <i>et al.</i> 4567 (MA)	EF185353	MF151008	DQ072035
<i>E. geoides</i>	Chile, Coquimbo, Choapa province, border of Petarca province, Taylor 10620 (MO)	MF150916	MF151009	DQ072048
<i>E. glandulosum</i>	Spain, León, Puente de la Palanca, Aedo & Patallo 4451 (MA)	HQ677608	-	DQ072083
<i>E. glandulosum</i>	Spain, Cuenca, Tragacete, Aldasoro & Alarcón 8829 (MA)	-	MF151010	-
<i>E. glaucophyllum</i>	Tunisia, 14 Km of Moulares, Aldasoro 3000 (MA)	JQ229792	DQ452870	DQ072016

<i>E. gruinum</i>	Jordania, Gerassa (Jerash), Vargas (MA)	EF185360	DQ452874	DQ072037
<i>E. guicciardii</i>	Macedonia, Ohrid, Aldasoro A2842 (MA)	EF185356	-	DQ072036
<i>E. guicciardii</i>	Turkey, Karaburun, Aldasoro A9178 (MA)	-	MF151011	-
<i>E. guttatum</i>	Tunisia, Feriana, Aldasoro A2973 (MA)	EF185344	MF151012	DQ072026
<i>E. hendrickii</i>	Turkey, Gümüşhane: Yağmurdere, Alpinar & T'Hart (ISTE 61049)	JN711469	-	JN711470
<i>E. hendrickii</i>	Turkey, Gümüşhane, A8452	-	MF151013	-
<i>E. hoefftianum</i>	Turkey, Göreme, Ask Vadisi, dept. Nevsehir, Muñoz-Garmendia <i>et al.</i> 4626 (MA)	EF185349	DQ452872	DQ072033
<i>E. jahandiezianum</i>	Morocco, Anti-Atlas, Iggherm, Gómiz s.n. (BC)	EF185342	-	DQ072022
<i>E. jahandiezianum</i>	Morocco, Anti-Atlas, Iggherm, Aldasoro s.n.	-	MF151014	-
<i>E. lucidum</i>	Spain, Huesca, Aneto, Aldasoro 2821 (MA)	EF185370	MF151015	DQ072084
<i>E. macrocalyx</i>	Spain, Cuenca, Tragacete, Navarro 2469 (MA)	EF185405	MF151016	DQ072087
<i>E. malacoides</i>	Spain, Cádiz, Zahara de la Sierra, Navarro 3424 (MA-685245)	EF185383	DQ452883	DQ072071
<i>E. maritimum</i>	Spain, A Coruña, San Andrés de Teixido, A1292	EF185379	KF997413	DQ072057
<i>E. mouretti</i>	Spain, Alange, Castillo, Moreno 9 (MA)	EF185414	MF151017	DQ072099
<i>E. moschatum</i>	Australia, Southern Lofty, Angas River, Strathalbyn, Smith 2393 (MEL1621233)	EF185409	HM849983	DQ072086
<i>E. nervulosum</i>	Morocco, Ifrane to Inmouzer, Mateos & Montserrat 6038 (BC-826634)	MF150917	MF151018	DQ072072
<i>E. neuradiifolium</i>	Spain, Albacete, Letur, Álvarez 1239 (MA591697)	HQ677611	-	DQ072069
<i>E. oxyrhynchum</i>	Cultivated from seeds collected in Egypt, Cairo-Suez Desert Road, Aldasoro 3487 (MA)	EF185343	MF151019	DQ072023
<i>E. paularense</i>	Spain, Guadalajara, Cañamares, Atienza, Aedo 4097 (MA588866)	EF185371	MF151020	DQ072077
<i>E. pelargoniflorum</i>	Cultivated from seeds collected in Ermenek, SE Turkey, Aldasoro 2838, 9150 (MA)	EF185347	DQ452873	DQ072041
<i>E. recoderi</i>	Spain, Málaga, Monte Tavirana, Ronda, Navarro 3449 (MA685241)	EF185395	MF151021	DQ072104
<i>E. reichardii</i>	Spain, Baleares Islands, Palma de Mallorca, Lluc, collado de Massanella, Morales <i>et al.</i> 1831 (MA)	EF185377	MF151022	-
<i>E. reichardii</i>	Spain, Menorca, Cap Favaritx, Martínez 173JM03	-	-	DQ072063
<i>E. rodiei</i>	France, Col de la Faye, Molero & Meseguer s.n (MA)	HQ677610	MF151023	HQ677621
<i>E. rupestre</i>	Spain, Barcelona, Boumort: Rocs de Santa, Molero s.n.	EF185369	-	DQ072085
<i>E. rupestre</i>	Blazier, J.C. & Jansen, R.K. 2013	EF185397	-	DQ072105
<i>E. rupicola</i>	Spain, Granada, Guéjar Sierra, Barranco del Guarón, Ruiz & Vidal	-	KF751824*	-
<i>E. ruthenicum</i>	Ukraine, Dniepopetrovskiaia, Sabrilovka, SE Kiev, Deryiova s.n. (LE)	-	MF151024	DQ072042
<i>E. sanguis-christi</i>	Spain, Castellón, Peñíscola, Barranco de la Torre Nova, Fabregat <i>et al.</i> 51 (MA)	EF185382	MF151025	DQ072055
<i>E. sebaceum</i>	Morocco, Boumia, 8 km NW of Er-Rachidia, Podlech 43213 (MA-464889)	EF185407	DQ452880	DQ072102
<i>E. stephanianum</i>	China, Nangqên Xian, NW of Jangkar between Jangkar and Yushu, Ho <i>et al.</i> 2892 (MO).	EF185346	DQ452871	DQ072027
<i>E. tataricum</i>	Russia, Jakasia, Payon, Ust-Bior, Voroniena s.n. (LE)	MF150918	MF151026	DQ072028
<i>E. texanum</i>	Price & Palmer (1993)	EF185345	L14693	DQ072026
<i>E. tordylioides</i>	Spain, Cádiz, Zahara de la Sierra, Navarro 3425 (MA685246)	EF185413	MF151027	DQ072100
<i>E. touchyanum</i>	Morocco, Sk-el-Had-de-Reggada, Arrington <i>et al.</i> (MA)	EF185411	MF151028	DQ072088
<i>E. trichomanifolium</i>	Turkey, Palandoken Dag, Erzürüm, Herrero 1705 (MA)	EF185357	MF151029	DQ072040
<i>E. trifolium</i>	Tunisia, Rohnia a Maktar, 30 km of Rohnia, Aldasoro 2936 (MA)	EF185389	DQ317052	DQ072076

<i>G. aculeolatum</i>	Tanzania, Mt. Kilimanjaro, Aizpuru s.n. (MA)	DQ525075	MF151030	DQ452905
<i>G. albanum</i>	Georgia, Aedo 3864 (MA593799)	MF150919	DQ452884	DQ452915
<i>G. andringitrense</i>	Madagascar, Aizpuru 2004	MF150920	-	MF151075
<i>G. andringitrense</i>	Park <i>et al.</i> , (2012)	-	JX913493	-
<i>G. antisanae</i>	Ecuador, Aedo 12946 (MA)	MF150921	JX913514	MF151076
<i>G. arabicum</i>	Ethiopia, Yirga Chefé-Agere Maryan, A10050	MF150922	-	MF151077
<i>G. arabicum</i>	Park <i>et al.</i> , (2012)	-	JX913494	-
<i>G. arboreum</i>	Kidd, S.E. (2005)	KY750236	JX913490	-
<i>G. argenteum</i>	Italy, Alpe di Caciaia, Sommier s.n. (MA)	DQ525062	MF151031	DQ072050
<i>G. asphodeloides</i>	Turkey, Bandirma, Erdek Castroviejo 15201 (MA)	AY944415	JX913458	AY944424
<i>G. atlanticum</i>	Morocco, Beni-Snassen, Maison Forrestière Ain-Almon Jury 15548 (MA643260)	MF150923	JX913489	DQ452924
<i>G. austroaenninum</i>	Italy, Abruzzos Herrero <i>et al.</i> 2018 (MA)	DQ525063	MF151032	DQ452929
<i>G. bicknellii</i>	USA, Smooth Rock Falls Cousineau 43581 (MA)	MF150924	KX678098	DQ452925
<i>G. biuncinatum</i>	Yemen, Hilla and Attuba, Wood 3126 (MA)	DQ525076	DQ452885	DQ452926
<i>G. bohemicum</i>	Norway, Engelskjon & Steilness s.n. (C)	AJ884945	MF151033	KU307196
<i>G. brasiliense</i>	Brasil, Rio de Janeiro, Itatiaia Alves 2762 (MA)	DQ525060	MF151034	DQ452901
<i>G. brevicaulis</i>	New Zealand, South Is., Mt. Aspiring National Park, Tal des Matukituki, Meebold 4748 (WU)	EU044753	MF151035	MF151078
<i>G. brycei</i>	Cultivated at Royal Botanic Garden of Madrid. Aedo 4474 (MA614475)	DQ525061	KP963390	DQ452911
<i>G. caeruleatum</i>	Bulgaria, Orelek Peak A8560	MF150925	JX913488	MF151079
<i>G. caespitosum</i>	USA, Colorado, Clear Creek, Nieto Feliner 2288 (MA)	MF150926	JX913520	MF151080
<i>G. californicum</i>	Cultivated at Royal Botanic Garden of Madrid, Aedo 5450	MF150927	MF151036	DQ452927
<i>G. campii</i>	Ecuador 10462, Loja, Cerro Toledo, Yangana	MF150928	JX913519	MF151081
<i>G. carolinianum</i>	Argentina, Misiones, Montecarlo, Guatambú, Keller 1978 (MA)	JF976464	HQ644043	MF151082
<i>G. cataractarum</i>	Morocco, Middle Atlas, S Timhadit, Aedo 4234 (MA593420)	DQ525068	MF151037	DQ452916
<i>G. cazorlense</i>	Spain, Jaén, Cazorla, Aedo 2587 (MA)	MF150929	-	DQ452930
<i>G. cinereum</i>	Spain, Huesca, Ordesa, Vargas 335pv02(1)	MF150930	L14695	DQ452931
<i>G. clarkei</i>	Cultivated in Barcelona Botanical Garden, A10445	MF150931	MF151038	MF151083
<i>G. collinum</i>	Spain, Uña, Cuenca A8827	MF150932	MF151039	MF151084
<i>G. columbinum</i>	Spain, Tarragona, Montsià, Sant Carles de la Ràpita, Velayos <i>et al.</i> 9387 (MA626513)	DQ525065	JX913505	DQ452910
<i>G. core-core</i>	Chile, Antofagasta, Toconao, Aedo 7006 (MA)	MF150933	JX913486	DQ452921
<i>G. costaricensis</i>	Costa Rica, Chirripó, Castroviejo 15137(MA)	DQ525066	MF151040	DQ452912
<i>G. crassipes</i>	Peru, Puno, Aldasoro 4521	MF150934	JX913515	MF151085
<i>G. crenophyllum</i>	Lebanon, Ehden, Pabot s.n. (G)	MF150935	-	MF151086
<i>G. cuneatum</i>	Hawaii, Hanulu, Saddla road near Puu (Greenwell)	MF150936	JX913506	MF151087
<i>G. dahuricum</i>	South Korea, Kyongsangnam-do, Mt. Gaya, Woo 2040801 (YNUH)	DQ192625	JX913474	MF151088
<i>G. dalmaticum</i>	Cultivate in Kew Gardens, Aldasoro <i>et al.</i> , 9168	DQ525072	JX913528	MF151089
<i>G. delavayi</i>	China, Sichuan, Derong Xian, Boufford (MA)	MF150937	MF151041	MF151090
<i>G. dissectum</i>	Spain, Teruel, Valderrobles, Aedo 5077 (MA)	AY944413	JX913459	KU307198
<i>G. divaricatum</i>	Turkey, Ghumushane, Ak Dagh, Aedo 468	DQ525069	DQ452886	DQ452906
<i>G. dolomiticum</i>	Spain, León, Priaranza, Ferradillo, Aedo 2433 (MA)	MF150938	-	DQ452903
<i>G. endressii</i>	France, Pyrénées Atlantiques, Béhorléguy, col de Aphanize, Aedo 2966 (MA)	MF150939	JX913485	DQ452920
<i>G. eriostemum</i>	South Korea, Kyongsangbuk-do, Mt. Ga, Woo 2040529 (YNUH)	DQ192633	JX913495	MF151091
<i>G. fallax</i>	Bolivia, La Paz, El Alto, A2013	MF150940	JX913512	MF151092

<i>G. glaberrimum</i>	Turkey, Bozkir-Aksehir, A9810	KX421239	KX421248	KU307201
<i>G. gracile</i>	Turkey, Tarbzon, Sumelas Monastery Valcárcel 370VV01	AJ884925	JX913462	DQ452918
<i>G. guatemalense</i>	Costa Rica, cultivate in MA A93622110	MF150941	MF151042	MF151093
<i>G. gymnocaulon</i>	Georgia, Cuba s.n. (G)	AJ884926	-	KU307203
<i>G. hanaense</i>	Kidd, S.E. (2005)	Kidd, 2005	U77899	Kidd, 2005
<i>G. himalayense</i>	Kidd, S.E. (2005)	KY750238	L01920	Kidd, 2005
<i>G. homeanum</i>	Kidd, S.E. (2005)	AY752471	U77901	Kidd, 2005
<i>G. ibericum</i>	Georgia, S. Ossetia, Ermanidon, Gochina s.n. (MA)	KX421241	-	KF696506
<i>G. incanum</i>	South Africa, Kirstenbosch Garden, Aldasoro s.n.	MF150943	JX913471	KT760575*
<i>G. kilimandsharicum</i>	Ethiopia, Plateau de Bale Mts., A10331	MF150944	MF151044	MF151097
<i>G. knuthianum</i>	Ecuador, Pichincha, A10464	MF150945	MF151045	MF151098
<i>G. knuthii</i>	South Korea: Kangwon-do, Mt. Keibang, Huh <i>et al.</i> 28207 (SKKH)	DQ192631	MF151046	MF151099
<i>G. koraiense</i>	South Korea, Jeju Island, Mt. Halla, Woo 2040816 (YNUH)	DQ192628	JX913472	MF151100
<i>G. koreanum</i>	South Korea, Daegu, Mt. Palgong, Woo 2040908 (YNUH)	DQ192635	JX913473	MF151101
<i>G. kotschy</i>	Iran, Mazandaran, A9888	MF150946	-	MF151102
<i>G. krameri</i>	South Korea, Gyeonggi-do, Mt. Soyo, Cha 73483 (SNUH)	DQ192627	MF151047	MF151103
<i>G. kurdicum</i>	Turkey, Diyarbakir, Davis 23217, (BM)	AJ884931	-	MF151104
<i>G. lainzii</i>	Colombia, Cundinamarca A95410	MF150947	MF151048	MF151105
<i>G. lanuginosum</i>	Spain, Barcelona, Mataró, Montserrat s.n. (MA)	AJ884943	MF151049	MF151106
<i>G. latistipulatum</i>	Ethiopia, Bale Mts. Plateau, A10351	MF150948	MF151050	MF151107
<i>G. libani</i>	Turkey, Iskenderum, Nydegger, 45264	AJ884932	MF151051	KU350681
<i>G. lucidum</i>	Morocco, Xauen, Jbel Lakra, Hauta-el-Kasdir, Aedo 4118 (MA)	KX167864	JN892289	DQ452914
<i>G. macrorrhizum</i>	Bulgaria, Rhodope, Smolyan, Herrero 2216 (MA)	DQ525073	L14696	DQ072043
<i>G. macrostylum</i>	Turkey, Selçuk, Baytop, 19153 (ISTE)	MF150949	JX913463	KU350683
<i>G. maculatum</i>	USA, Missouri, Howel Co., Summers 9468 (MA)	MF150950	KP644002	MF151108
<i>G. maderense</i>	Madeira, Bica da Cana, Aedo 9696 (MA)	DQ525074	JX913524	KT760576*
<i>G. magellanicum</i>	Chile, Magallanes, Aedo 7445 (MA)	MF150951	MF151052	MF151109
<i>G. malviflorum</i>	Spain, Granada, Sierra Nevada, Smelsson (G)	MF150952	JX913461	MF151110
<i>G. mascatense</i>	India, Udampur, Jammu-Cashmir A6560	KJ004320	JX913526	MF151111
<i>G. melanandrum</i>	China, Yunnan, Aldasoro 5880	JF976466	JF941755	MF151112
<i>G. microphyllum</i>	Chile, Magallanes, Pisano 2576, (MO)	EU044759	-	MF151113
<i>G. molle</i>	Canada, British Columbia, Vancouver, Blinkhorn Mountain, Metchosin MF70	KX167627	KX678551	KY697528
<i>G. multiceps</i>	Venezuela, Mérida, Sierra de la Culata A71203	MF150953	JX913510	MF151114
<i>G. multipartitum</i>	Ecuador, Larecaya, Mandoni 786 (W)	MF150954	JX913518	MF151115
<i>G. nanum</i>	Morocco, Atlas Medio, Jbel Bou Iblane Aedo 4199 (MA593345)	DQ525064	MF151053	DQ452904
<i>G. nepalense</i>	Japan, Hokkaido, Shireteki, Estébanez s.n. (MA)	DQ192632	JX913500	MF151116
<i>G. nodosum</i>	Italy, Abruzzo, Ceppo Herrero <i>et al.</i> 1955	KX661379	JX913480	DQ452922
<i>G. ocellatum</i>	Ethiopia, Birbirsá, Valle del Gara Muleta, Aldasoro 10427	MF150955	L14698	MF151117
<i>G. oreganum</i>	USA, Oregon, Conwalls, Halse H5533 (MO)	MF150956	JX913482	MF151118
<i>G. palmatum</i>	Madeira, Porto Moniz, Chao Ribeira, Vargas 125PV98 (MA)	AY944411	JX913525	AY944418
<i>G. palustre</i>	Armenia, Panbaba 11816-10439 (MA)	KX421244	JX913476	KU350684
<i>G. patagonicum</i>	Argentina, Chubut, Moleró, 14210 (BC)	MF150957	MF151054	MF151119
<i>G. peloponnesiacum</i>	Turkey, Nisa <i>et al.</i> 891, (MA)	AJ884934	-	AJ884721

<i>G. phaeum</i>	France, Licq, Xuberoa, Aedo 2967 (MA)	DQ525078	KP963384	DQ452902
<i>G. platypetalum</i>	Turkey, Rice, Nisa <i>et al.</i> 893 (MA)	AJ884938	JX913460	MF151120
<i>G. potentilloides</i>	Australia, Vargas 2346PV01	EU044758	MF151055	MF151121
<i>G. pratense</i>	Spain, Madrid, Montejo de la Sierra, Aldasoro s.n. (MA)	KX167628	KP963381	HM590294
<i>G. pseudosibiricum</i>	China, cultivate in MA A9366	MF150958	MF151056	MF151122
<i>G. psilostemon</i>	Turkey, Rize, S. Nisa 765 (MA)	MF150959	KF696397	KF696507
<i>G. pulchrum</i>	RSA, Natal, Sari Pass, A15016	MF150960	MF151057	MF151123
<i>G. purpureum</i>	Spain, Badajoz, Olivenza, Aedo 6050 (MA)	KX167811	HM850027	KU350687
<i>G. pusillum</i>	Bakker <i>et al.</i> (2000)	-	AF167151	-
<i>G. pusillum</i>	Morocco, Taffert, Atlas, Aedo 4144 (MA)	DQ525070	-	DQ452907
<i>G. pylzowianum</i>	Tibet, Markan Zian, Boufford, 29392	KX259269	JX913483	MF151125
<i>G. pyrenaicum</i>	Morocco, Atlas, S Timhadit, Aedo 4235 (MA)	DQ525067	KF997498	DQ452908
<i>G. reflexum</i>	Cultivated in MA, Aedo 3865 (MA)	MF150961	JX913457	DQ452909
<i>G. refractum</i>	China, Sichwan, Jiulong Xian, Boufford 33190 (MA)	MF150962	JX913484	MF151126
<i>G. renardii</i>	Georgia, Konechnaya & Khaare s.n. (LE)	AJ884940	KP963379	MF151127
<i>G. retrorsum</i>	Australia, New South Wales, Monaro highway-Burra road, Crawford 2137 (CANB)	EU044749	MF151058	MF151128
<i>G. reuteri</i>	Spain, Canary Is., Tenerife, Pico Vilanos, Aedo 6694 (MA)	MF150963	KJ595666	MF151129
<i>G. richardsonii</i>	Kidd, S.E. (2005)	Kidd, 2005	JX913521	-
<i>G. robertianum</i>	United Kingdom, Reading Pankhurst 2 RNG, Bakker <i>et al.</i> 2000	DQ525071	JX913523	AB693036
<i>G. rotundifolium</i>	Turkey, Evciler, Kaz Dagh, Castroviejo 15237 (MA643798)	KX167823	JX913469	DQ452928
<i>G. sanguineum</i>	Spain, Navarra, Petilla, Aizpuru 3865 (MA)	KX166063	KP963377	MF151131
<i>G. schlechteri</i>	RSA, Natal, Mike Pass, A10437	MF150965	MF151059	MF151132
<i>G. sessiliflorum</i>	Chile, Punta Arenas, Magallanes 7486 (MA)	AY752474	JX913492	MF151133
<i>G. shikokianum</i>	South Korea, Jeju Island, Mt. Halla, B. Woo 2040855 (YNUH)	DQ192629	JX913477	MF151134
<i>G. siboldioides</i>	Ecuador, Chimborazo, Heinrich 962 (G)	MF150966	MF151060	MF151135
<i>G. sibiricum</i>	Japan, Hokkaido, Estébanez, 1522 (MA)	JF976470	JF941760	KX259270
<i>G. sintenisii</i>	Turkey, Trabzon-Torul, Nisa <i>et al.</i> 712 (MA)	AY944417	-	AY944423
<i>G. soboliferum</i>	Japan, Hiroshima, Kagasuyama Park, Estebanez s.n. (MA)	DQ192626	JX913491	MF151136
<i>G. solanderi</i>	Cultivate in Mainz Botanical Garden, Aldasoro 10878	AY752467	JX913487	MF151137
<i>G. strictipes</i>	China, Sinlen Xian, BC33029	MF150967	JX913468	MF151138
<i>G. subargenteum</i>	Spain, Alto Campo, A9196	MF150968	JX913465	MF151139
<i>G. subacutum</i>	Turkey, Konya-Hadim, A9817	MF150969	MF151061	KU350692
<i>G. subcaulescens</i>	Greece, Kilini Korinthia	MF150970	JX913466	KU214585
<i>G. sylvaticum</i>	Spain, Vall d'Aran, Bagergue, Aedo 4842 (MA)	KU974050	KF997367	DQ452923
<i>G. thunbergii</i>	Park (2006)	DQ192638	JX913499	AB693037
<i>G. traversii</i>	New Zealand, S. Coastal Otago and Fiordland (MO)	EU044755	KP963375	MF151140
<i>G. tripartitum</i>	Park (2006)	DQ192624	JX913504	-
<i>G. tuberosum</i>	Turkey, Ermenek, Aldasoro A9140	HE795062	DQ452887	DQ452919
<i>G. versicolor</i>	Italy, Pessocostance A3444	HE795063	-	HE795467
<i>G. viscosissimum</i>	USA, Idaho, Boise Co., Bull Trout Lake, A8726	MF150971	KX679074	MF151142
<i>G. wilfordii</i>	China, Tchen-keoutien, Farges s.n. (P)	DQ192623	MF151062	MF151143
<i>G. wlassovianum</i>	Russia, Baikal L., Komovalov s.n. (MA)	MF150972	MF151063	MF151144
<i>G. yedoense</i>	Japan, Toyama-ken, Tateyama-cho, Mt Tsurugi-dake, Estébanez 182 (MA)	-	MF151064	DQ452913
<i>G. yeoi</i>	Madeira, Cantias, Aedo 6694 (MA)	DQ525077	KP963374	MF151145
<i>Hypseocharis bilobata</i>	Peru, Cuzco, Aedo 5256B (MA)	HE795067	KF240616*	DQ452890
<i>H. pimpinellifolia</i>	Price & Palmer (1993) Bolivia	HE795068	DQ317048	DQ45890
<i>Monsonia angustifolia</i>	RSA, N Transvaal, Penther 2218 (W)	AF505632	KX470490	DQ452891

<i>M. attenuata</i>	RSA, Cathedral Peak, Carbutt 271 (MSUN)	AF505630	KX470491	AY036161
<i>M. brevirostrata</i>	RSA, Lesobeng, Germishuizen 1238 (MO)	AF505631	KX470492	AY036159
<i>M. camdeboense</i>	Cultivated in Kirstebosch (South Africa) 11E28of02	KX470456	KX470494	DQ452900
<i>M. ciliata</i>	RSA, Steinkopf, Anenous Pass, Aldasoro 9034 (MA)	KX470457	KX470495	AY036166
<i>M. crassicaule</i>	RSA, 33 km Steinkopf, Aldasoro 2416 (MA)	AF505637	KX470496	AY036165
<i>M. deserticola</i>	Namibia, Aus, Lavranos & Pehlemann 19636 (MO)	AF505652	KX470497	AY036178
<i>M. drudeana</i>	Namibia, Gariiep 13 km from the station, Aldasoro 9068 (MA)	KX470458	KX470498	KX470521
<i>M. emarginata</i>	Cultivated in MA from Silverhills seeds (RSA)	HE795069	KX470499	DQ452893
<i>M. flavescens</i>	RSA, Oranjemund, Aldasoro 9099 (MA)	AF505636	KX470500	AY036164
<i>M. glauca</i>	RSA, Upington Karoides, UM581 (MSUN)	AF551333	KX470493	AF505643
<i>M. grandifolia</i>	RSA, 10km NE Ixopo Highland Sourveld (MSUN)	AF505629	KX470502	AY036158
<i>M. heliotropiodes</i>	Algeria, Oudja, Molero, BC-804188	AF505651	KX470503	DQ452897
<i>M. herrei</i>	RSA, Steinkopf-Vioolsdrift, Aldasoro 9042	KX470459	KX470504	KX470522
<i>M. ignorata</i>	Namibia, Windhoek, Sossusvlei, Vargas 421PV02 (MA)	AF505647	KX470505	DQ072010
<i>M. inermis</i>	Namibia, 3km SW Rosh Pinah (MSUN)	AF505634	KX470506	AY036162
<i>M. lheritieri</i>	RSA, Garies-Bitterfontein, Krad A9078	KX470460	KX470507	KX470523
<i>M. longipes</i>	Ethiopia, Negele 37 km to Moyale, Aldasoro10288	KX470461	KX470508	KX470524
<i>M. luedertziانا</i>	RSA, 18 Km Fish River Canyon, Aldasoro 9074	AY036173	AF505646	KX470509
<i>M. marlothii</i>	Namibia, Swakopmund, Khan canyon Vargas 423PV03 (MA)	KX470462	DQ452867	DQ452899
<i>M. mossamedensis</i>	Angola, S. Orumpembe, Skeleton Coast, 3603 (COI)	AY036169	AF505641	KX470510
<i>M. multifida</i>	RSA, Kirstenbosch, Gassner (MA)	AF505635	KX470511	DQ452898
<i>M. natalensis</i>	RSA, Port Edward, Umtauna 280CC	AF505626	KX470512	AY036156
<i>M. nivea</i>	Morocco, Taoujgalt, High Atlas, S M'goun mountain Staudinger s.n.	AF505649	DQ452868	DQ452895
<i>M. parvifolia</i>	Namibia, Naroep, Great Buchsmanland, Schlechter s.n. (W)	AF505644	KX470514	DQ452894
<i>M. patersonii</i>	Namibia, Aus-Witput, Aldasoro 9054 (MA)	KX470463	KX470515	AY036168
<i>M. praemorsa</i>	RSA, Natal, Clermont, Wood s.n. (G)	KX470464	KX470516	DQ452892
<i>M. salmoniflora</i>	Namibia, Aus-Witput 46 km of Aus, Aldasoro 9049	AF505639	KX470517	AY036167
<i>M. senegalensis</i>	Ethiopia, Negele to Moyale, Aldasoro 10299	AF505633	KX470518	AY036179
<i>M. speciosa</i>	RSA, Tulbagh Cape Colony	AF505648	KX470519	DQ452896
<i>M. umbellata</i>	Namibia, cult. in Kirstenbosch, van Jaarsveld 8699	AF505645	KX470520	AY036172
<i>M. vanderietiae</i>	RSA, Cookhouse CPG 8471 (BM)	KX470465	AF167150	AF167150
<i>Pelargonium abrotanifolium</i>	Cultivated in Barcelona Botanical Garden, A10451	MF150973	JQ479167	AF256592
<i>P. acetosum</i>	RSA, Cape, Lins-Balchin s.n. (STEU)	MF150974	KF696479	AY352843
<i>P. acraeum</i>	RSA, Anenous Pass, Aldasoro <i>et al.</i> 9040 (MA)	AY352880	JQ479174	AY352844
<i>P. album</i>	RSA, Pilgrims rest, Mpumalanga, GBB548 (BM)	Z95260	JQ479168	Z95287
<i>P. alchemilloides</i>	RSA, Kirstenbosch, Aldasoro <i>et al.</i> 9091 (MA)	MF150975	DQ317057	AF256606
<i>P. alpinum</i>	RSA, Gydopass Ceres, W Cape, STEU 3574 (STEU)	AF256562	-	AF036073
<i>P. alternans</i>	RSA, Worcester, W Cape, STEU 4355 (STEU)	AF256545	JQ479152	AF036052
<i>P. althaeoides</i>	RSA, Stellenbosch, Marais Park H851 (MSUN)	Z95278	KF696447	Z95299
<i>P. anceps</i>	RSA, East London, E Cape, STEU 3797 (MSUN)/(STEU)	Z95267	KF696466	Z95292
<i>P. anethifolium</i>	Cultivated in Barcelona Botanical Garden, A10443	AF256540	MF151065	AF036041
<i>P. antidysentericum</i>	Namibia, Spitzkop, Rosh Pinah, STEU 3337 / MS137 (MSUN)	AY352881	KF696498	KF696555

<i>P. appendiculatum</i>	RSA, Leipoldtville, W Cape, STEU 3233 (BM)	AF256551	KF696410	AF036062
<i>P. aridum</i>	RSA, Kirstenbosch, Aldasoro <i>et al.</i> 9093 (MA)	MF150976	MF151066	AY352847
<i>P. articulatum</i>	RSA, Karooport, W Cape, STEU 2309 (STEU)	-	-	AF167144
<i>P. asarifolium</i>	RSA, Eikeboom, on Slanghoek road, Worcester, STEU 2442 (STEU)	AY036208	JQ479151	AY352848
<i>P. auritum</i>	RSA, Plettenbergbaai, W Cape, STEU 3216 (BM)	AF256553	JQ479187	AF036064
<i>P. australe</i>	Australia, Tasmania CPG 8829 (BM)	Z95256	KJ916501	Z95280
<i>P. betulinum</i>	RSA, Kirstenbosch, Aldasoro <i>et al.</i> 9095 (MA)	MF150978	KF696441	AF036078
<i>P. boranense</i>	Ethiopia, ex Betty Marais (BM)	-	KF696493	AF256611
<i>P. bowkeri</i>	RSA, Harrismith, Orange Free State, STEU 2148 (BM)	AF256557	JQ479160	AF036068
<i>P. brevipetalum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696422	KF696518
<i>P. burgerianum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696448	KF696529
<i>P. buysii</i>	RSA, Montagu, Koo Valley, W Cape, H 881 (MSUN)	Z95272	-	Z95301
<i>P. caespitosum</i>	RSA, Eselbank se Koppe, W Cape, NBG 727/88 (NBG)	-	KF696453	AF256600
<i>P. caffrum</i>	Cultivated at Royal Botanic Garden of Madrid, Aedo 4472 (MA)	AF256556	-	DQ452917
<i>P. candicans</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	DQ317055	KF696551
<i>P. capillare</i>	Cultivated in Barcelona Botanical Garden, A10341	-	MF151067	AF036085
<i>P. capitatum</i>	Weng <i>et al.</i> (2012)	-	JQ412405	-
<i>P. carneum</i>	Bakker <i>et al.</i> (2004)	AF256542	MF151068	-
<i>P. carnosum</i>	RSA, Yzerfontain, Aldasoro <i>et al.</i> 9025	MF150979	JQ479143	AF036048
<i>P. caucalifolium</i>	RSA, Riviersonderend, W Cape, STEU 1191 (STEU)	-	KF696492	AF167141
<i>P. caylae</i>	Madagascar, Tananarive B.G., STEU 2198 (MSUN)	AY352882	KF696485	KF696542
<i>P. ceratophyllum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696418	KF696520
<i>P. citronellum</i>	RSA, Ladismith, W Cape, STEU 2707 (STEU)	AF256568	JQ479186	AF036077
<i>P. columbinum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	Z95271	KF696469	KF696538
<i>P. coronopifolium</i>	RSA, Pakhuis Pass, W Cape, 731/88 (NBG)	AF256571	KF696449	AF036083
<i>P. cortusifolium</i>	Namibia, CPG 9111 (BM)	AF256546	-	AF256594
<i>P. cotyledonis</i>	St. Helena CPG8472 (BM)	Z95269	KJ916503	Z95294
<i>P. crassicaule</i>	RSA, Cape, Aldasoro <i>et al.</i> 9078 (MA)	AF256547	KF696435	KF696526
<i>P. crassipes</i>	Weng <i>et al.</i> (2012)	-	JQ479149	JQ479194
<i>P. crispum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696439	KF696531
<i>P. crithmifolium</i>	RSA, Anenous Pass, N Cape, STEU 2794 (STEU)	AF256543	JQ479153	AF036046
<i>P. cucullatum</i>	RSA, Cape peninsula, W Cape, CPG 6319 (BM)	AF256569	JQ479161	KF696530
<i>P. dasyphyllum</i>	Cultivated in Barcelona Botanical Garden, A10342	-	MF151069	AF036047
<i>P. denticulatum</i>	RSA, Herbertsdale, W Cape, STEU 1427 (MSUN)	AY352883	KF696445	AY352850
<i>P. desertorum</i>	RSA, Rosyntjiesberg, Richtersveld, N Cape, STEU 0634 (MSUN)	-	JQ479157	KF696528
<i>P. dichondrifolium</i>	RSA, Cradock, E Cape, STEU 3981 (STEU)	AF256537	JQ479188	AF036038
<i>P. dolomiticum</i>	From seed (MSUN)	-	JQ479184	AF256612
<i>P. drummondii</i>	Australia, from seed supplied by J. Llewellyn, CPG 86154 (BM)	Z95255	KF696464	Z95279
<i>P. echinatum</i>	RSA, N Cape, (MSUN)	AF256567	KJ916505	AY352851
<i>P. elegans</i>	RSA, Lorraine, Port Elizabeth, E Cape, 298/90 (NBG)	-	KF696450	AF036086
<i>P. elongatum</i>	RSA, Cape, Simonstown CPG8890 (BM)	-	L14703	AF167146
<i>P. endlicherianum</i>	Turkey, Bozkir-Aksehir, A9806	MF150980	JQ479163	KF696543
<i>P. erodioides</i>	Bakker <i>et al.</i> (1998)	Z95258	-	Z95282
<i>P. exhibens</i>	RSA, Grahamstown, E Cape, STEU 1889 (BM)	-	KF696496	AF167139

<i>P. exstipulatum</i>	RSA, Little Karoo STEU1656 (STEU)	MF150981	L14702	Z95284
<i>P. fasciculaceum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	AY036188	KF696404	KF696512
<i>P. filifolium</i>	Cultivated in Mainz Botanical Garden, A11871	MF150982	MF151070	MF151146
<i>P. flabellifolium</i>	RSA, Loteni, Kwazulu-Natal, GBB 505 (BM)	AF256558	-	AF036069
<i>P. fragrans</i>	Park (2006)	-	KU556622	-
<i>P. frutetorum</i>	RSA, Bathurst, E Cape, STEU 754, (MSUN)	AY352884	KF696477	AY352852
<i>P. fulgidum</i>	RSA, Nuwerus, Aldasoro <i>et al.</i> , 9035 (MA)	MF150983	JQ479155	KF696516
<i>P. fumariifolium</i>	RSA, Sutherland, N Cape, STEU 3675 (STEU)	AY036217	-	AY352853
<i>P. gibbosum</i>	RSA, Llandudno, W Cape, STEU0563 (STEU)	Z95277	JQ479142	Z95298
<i>P. glechomoides</i>	Kenya, Huri Hills, CPG 9027 (BM)	MF150984	JQ479165	AF256593
<i>P. glutinosum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696443	KF696532
<i>P. grandicalcaratum</i>	RSA, Botterkloof, N Cape, STEU 2055 (STEU)	-	KF696481	AF167148
<i>P. grandiflorum</i>	RSA, N Cape, CPG 7045 (BM)	AF256563	JQ479171	AF036074
<i>P. graveolens</i>	RSA, George, W Cape, STEU 3039 (MSUN)	KF871281	KF894699	AF036082
<i>P. griseum</i>	RSA, Steynsburg, E Great Karoo, E Cape, CPG 8518 (BM)	-	KF696501	AF036091
<i>P. grossularioides</i>	RSA, Gydopass Ceres, W Cape, H876 (MSUN)	Z95270	JQ479183	Z95290
<i>P. havlasae</i>	WAustralia, 50 miles N of Albany, CPG 8893 (BM)	-	-	AF036037
<i>P. hermaniifolium</i>	RSA, Jonaskop, W Cape, STEU 3475 (MSUN)	AY352885	-	AY352854
<i>P. hispidum</i>	RSA, W Cape, Swartberg Range, A9459	AY352886	MF151071	AY352855
<i>P. hypoleucum</i>	RSA, Happy Valley, Greyton, W Cape, STEU3380 (MSUN/STEU)	Z95266	KF696467	Z95291
<i>P. hystrix</i>	RSA, Matjesfontein, W Cape, STEU 3932 (MSUN)	AY352887	JQ479181	AY352856
<i>P. incrassatum</i>	Touloumenidou <i>et al.</i> (2004)	AY036190	JQ479139	KF696510
<i>P. iocastum</i>	RSA, Caledon Botanic Garden, W Cape, H867 (MSUN)	Z95273	KF696468	Z95302
<i>P. ionidiflorum</i>	RSA, Grahamstown, E Cape, STEU1888 (BM/STEU)	Z95262	KF696457	Z95285
<i>P. karooicum</i>	South Africa, Naries, A8995	MF150985	JQ479158	AF167149
<i>P. klinghardtense</i>	Weng <i>et al.</i> (2012)	-	JQ479136	JQ479191
<i>P. laevigatum</i>	RSA, Wuppertal, W Cape, STEU 1085 (MSUN)	AY352888	-	AY352857
<i>P. lanceolatum</i>	RSA, Sandhills, Worcester, W Cape, STEU 2260 (BM)	AF256564	-	AF036075
<i>P. laxum</i>	RSA, E Cape, STEU 2374 (MSUN)	-	KF696423	AF036049
<i>P. leipoldtii</i>	RSA, Worcester, W Cape, STEU 2327 (STEU)	AY036191	-	AY352858
<i>P. leptum</i>	RSA, Lemoenkloof, Paardeberg, W Cape, STEU 4385 (STEU)	AY036192	-	AY352859
<i>P. leucophyllum</i>	RSA, Martinskloof, E Cape, V3031 (MSUN)	-	-	AF036039
<i>P. lobatum</i>	RSA, Worcester, W Cape, G&C 42 (BM)	-	JQ479145	AF036042
<i>P. longicaule</i>	RSA, Simmonstown, Orangekloof, Schlechter 64 (P)	-	MF151072	AY352860
<i>P. longiflorum</i>	Touloumenidou <i>et al.</i> (2004)	AY036226	-	-
<i>P. luridum</i>	Tanzania, CPG 8854 (BM)	AF256559	JQ479162	KF696517
<i>P. luteolum</i>	RSA, Worcester, W Cape, STEU 0763 (STEU)	AF256555	JQ479176	AF036066
<i>P. magenteum</i>	RSA, Cape, Lins-Balchin s.n. (STEU)	-	KF696438	AF036053
<i>P. minimum</i>	RSA, Montagu, W Cape, STEU 4361 (MSUN)	AF256539	KF696470	KF696540
<i>P. mirabile</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696436	KF696525
<i>P. mollicomum</i>	RSA, Grahamstown, E. Cape, STEU 3282 (BM)	AF25657	KF696494	KF696552
<i>P. moniliforme</i>	RSA, Verlatekloof, Sutherland, N Cape, STEU 3660 (STEU)	AY036222	-	AY352861
<i>P. multibracteatum</i>	Yemen, Dalil, CPG 7757 (BM)	-	KF696472	AF167145
<i>P. multiradiatum</i>	RSA, Langebaan-Yzerfontein, W Cape, STEU 2652 (BM)	-	JQ479137	AF036043
<i>P. mutans</i>	RSA, Mkuze river, Veerplaats, Kwazulu-Natal, GBB 513 (BM)	AF256572	KF696502	AF167138
<i>P. myrrhifolium</i>	RSA, Good Hope Cape, Aldasoro 9045	AY352889	JQ479154	AY352862

<i>P. nanum</i>	RSA, Cape, Schlechter, 11108 (P)	MF150986	JQ479147	KF696534
<i>P. nervifolium</i>	RSA, Cape, Laingsburg, A9049	MF150987	AY036196	AY352863
<i>P. oblongatum</i>	RSA, Studer's Pass, N Cape, STEU 819 (STEU)	-	JQ479173	AY352864
<i>P. otaviense</i>	Namibia, CPG 4791 (BM)	-	JQ479164	KF696545
<i>P. ovale</i>	RSA, Rooiberghut, Cape, 1003/90 (NBG)	-	JQ479185	AF256599
<i>P. paniculatum</i>	Namibia, 30 km N of Rosh Pinah, AM 80 (MSUN)	AF256544	KF696425	AF036051
<i>P. papilionaceum</i>	RSA, Cape, CPG 428-94 (BM)	-	KF696440	AF256597
<i>P. parviflorum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696420	KF696519
<i>P. patulum</i>	RSA, Ceres, W Cape, STEU 1088 (STEU)	-	-	AF036076
<i>P. peltatum</i>	RSA, W Cape, CPG 5685 (BM)	AF256575	JQ479170	AF167143
<i>P. petroselinifolium</i>	RSA, Worcester, W Cape, STEU 2315 (STEU)	AY036207	-	AY352865
<i>P. pinnatum</i>	Touloumenidou <i>et al.</i> (2004)	AY036225	-	-
<i>P. praemorsum</i>	RSA, Nieuwoudtville to Brandkop, N Cape, STEU 1575 (BM)	-	JQ479156	AF167137
<i>P. pseudofumarioides</i>	RSA, STEU2981 (MSUN/STEU)	Z95274	-	Z95295
<i>P. pulverulentum</i>	RSA, 32 km from Cathcart, E Cape, STEU 1863 (MSUN)	-	KF696430	KF696524
<i>P. punctatum</i>	Cultivated in Barcelona Botanical Garden, A10333	AY036213	JQ479177	JQ479195
<i>P. quercetorum</i>	Turkey, Tunceli, Aldasoro <i>et al.</i> , 7887	MF150988	DQ317056	KF696544
<i>P. quercifolium</i>	RSA, Meiringspoort, W Cape, STEU 1275 (MSUN)	AY352890	JQ479180	KF696533
<i>P. quinquelobatum</i>	Kenya, HN 01865 13533 E (MSUN)	AF256576	JQ479175	AF256608
<i>P. radens</i>	RSA, Mountaindrive, Grahamstown, B1019 (WAG)	AF256570	-	AY352867
<i>P. radulifolium</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696432	KF696523
<i>P. ranunculophyllum</i>	RSA, E Cape, 97ASAI3651 (MSUN)	AY352891	KF696474	AY352868
<i>P. rapaceum</i>	RSA, Ceres, W Cape, G&C 238 (BM)	AF256554	L14704	AF036065
<i>P. redactum</i>	Namibia, 8 km W of Aus on B4 AL 2738 (MSUN)	AF256574	L14702	AF167134
<i>P. reniforme</i>	RSA, Hounslow, Grahamstown, E Cape, STEU 683 (STEU)	AF256538	DQ317054	Z95286
<i>P. rodneyanum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	-	KF696462	KF696539
<i>P. rotundipetalum</i>	SA, Annis Kop, N Cape, STEU 4063 (STEU)	-	KF696421	AF036050
<i>P. scabrum</i>	RSA, Kirstenbosch, Aldasoro <i>et al.</i> 9034 (MA)	-	MF151073	AF036080
<i>P. schizopetalum</i>	RSA, Prins Alfred Pass, W Cape, STEU 1997 (MSUN)	AF256561	KF696417	AF036072
<i>P. senecioides</i>	RSA, Leipoldtville, W Cape, CPG 8855 (BM)	MF150989	-	AF167135
<i>P. sericifolium</i>	RSA, Spektakel Pass, N Cape, STEU 2068 (BM/STEU)	AF256549	JQ479159	AF036057
<i>P. setulosum</i>	RSA, McGregor, W Cape, 1028/84 (NBG)	-	-	AF036081
<i>P. sidoides</i>	Cultivated in Barcelona Botanical Garden, A10345	MF150990	KF696459	KF696536
<i>P. socotrana</i> (= <i>P. insularis</i>)	Yemen, Samha, Socotra, RBG Edinburgh 1999 0482 (E)	MF150991	-	AY352869
<i>P. spinosum</i>	RSA, Desert Mts N Steinkopf, N Cape, CPG 8470 (BM)	-	JQ479179	AF167147
<i>P. stipulaceum</i>	RSA, Matjiesfontein, W Cape, RSA, STEU 0757 (BM)	AF256550	JQ479166	AF036058
<i>P. sublignosum</i>	RSA, Ceres, W Cape, STEU1122 (MSUN)	-	-	AY352870
<i>P. suburbanum</i>	RSA, E Cape, RBG Edinburgh 20001200	AY352892	KF696489	AY352871
<i>P. tenuicaule</i>	Namibia, Namuskluft, STEU 3061 (MSUN)	AY352893	-	AY352873
<i>P. ternatum</i>	RSA, Kirstenbosch, Aldasoro <i>et al.</i> 9024 (MA)	AF256565	MF151074	AF256596
<i>P. tetragonum</i>	RSA, Worcester, W Cape, CPG 7993 (BM)	-	KJ916511	KF696553
<i>P. tomentosum</i>	RSA, Marloth Reserve, Swellendam, W Cape, STEU 0486 (MSUN)	-	JQ479182	AY352874
<i>P. tongaense</i>	RSA, Pongola river, McKane's point, Kwazulu-Natal, STEU 3074 (BM)	MF150992	JQ479190	AF036089
<i>P. torulosum</i>	RSA, Old Komsberg Pass Road, N Cape, STEU 4310 (STEU)	-	KF696413	AF036059

<i>P. tragacanthoides</i>	RSA, Bergzebrapark, Cradock, E Cape, STEU 1728	-	KF696500	KF696556
<i>P. transvaalense</i>	RSA, Transvaal, Barsbeton, Lins-Balchin s.n. (STEU)	MF150993	JQ479148	KF696541
<i>P. triandrum</i>	Röschenbleck <i>et al.</i> (2014)	AY036212	KF696401	KF696511
<i>P. tricolor</i>	RSA, Rooiberg Mt., W Cape, CPG 8076 (BM)	-	KF696452	AF036084
<i>P. trifidum</i>	RSA, Meiringspoort, W Cape, STEU 2730	-	JQ479135	AF167136
<i>P. triste</i>	RSA, Potberg, De Hoop Nature Reserve, W Cape, STEU 2234 (BM)	AF256541	KF696431	KF696522
<i>P. undulatum</i>	RSA, Patatsrivier, Ceres Karoo, Montagu, W Cape, STEU 2820 (STEU)	AY036186	-	AY352877
<i>P. vinaceum</i>	RSA, Wyepoort, Richtersveld, Springbok, N Cape, STEU 4218 (STEU)	AY036223	-	AY352878
<i>P. violiflorum</i>	Weng <i>et al.</i> (2012)	AY036187	JQ479138	JQ479192
<i>P. vitifolium</i>	RSA, SW Cape, HI88 (MSUN)	AY352894	JQ734521	AY352879
<i>P. whytei</i>	Mozambique, ex DH, CPG 8634 (BM)	-	KF696490	AF167142
<i>P. worcesterae</i>	RSA, E Cape, ex GG, CPG 8610 (BM)	-	AF256610	KF696495
<i>P. xerophyton</i>	RSA, ex Kirstenbosch Botanic Gardens, CPG 8319 (BM)	Z95276	JQ479169	KF696527
<i>P. zonale</i>	RSA, Seweweekspoort, W Cape, STEU 1071 (BM)	DQ345326	JQ479169	AF036088

Supplementary references

- Ali, S. S. *et al.* (2013) Out of Africa: Miocene dispersal, vicariance, and extinction within Hyacinthaceae subfamily Urgineoideae. *Journal of Integrative Plant Biology*, **55**, 950–964.
- Bakker, F. T., Hellbrügge, D., Culham, A. & Gibby, M. (1998) Phylogenetic relationships within *Pelargonium* sect. *Peristera* (Geraniaceae) inferred from nrDNA and cpDNA sequence comparisons. *Plant Systematics and Evolution*, **211**, 273–287.
- Bakker, F. T., Culham, A., Hettiarachi, P., Touloumenidou, T. & Gibby, M. (2004) Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes. *Taxon*, **53**, 17–31.
- Balao, F., Valente, L. M., Vargas, P., Herrera, J. & Talavera, S. (2010) Radiative evolution of polyploid races of the Iberian carnation *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). *New Phytologist*, **187**, 542–551.

- Calviño, C. I., Teruel, F. E. & Downie, S. R. (2016) The role of the Southern Hemisphere in the evolutionary history of Apiaceae, a mostly north temperate plant family. *Journal of Biogeography*, **43**, 398–409.
- Harmon, G. D. & Stamp, N. E. (1992) Effects of postdispersal seed predation on spatial inequality and size variability in an annual plant, *Erodium cicutarium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany*, **79**, 300–305.
- Hoyo, A., García-Marín, J. L. & Pedrola-Monfort, J. (2009) Temporal and spatial diversification of the African disjunct genus *Androcymbium* (Colchicaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **53**, 848–861.
- Kidd, S. E. (2005) *Molecular phylogenetics of the Hawaiian geraniums*. M.Sc thesis. Ohio: Bowling Green State University.
- Loria, M. & Noi-Meir, I. (1980) Dynamics of some annual populations in a desert-loess plain. *Israel Journal of Botany*, **28**, 211–225.
- Norup, M. F. *et al.* (2015) Evolution of *Asparagus* L.(Asparagaceae): out-of-South-Africa and multiple origins of sexual dimorphism. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **92**, 25–44.
- Onstein, R. E., Carter, R. J., Xing, Y., Richardson, J. E. & Linder, H. P. (2015) Do Mediterranean-type ecosystems have a common history? Insights from the Buckthorn family (Rhamnaceae). *Evolution*, **69**, 756–771.
- Park, S. J. (2006) Phylogenetic study of Korean *Geranium* (Geraniaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, **36**, 91–108.
- Pirie, M. D. *et al.* (2016) The biodiversity hotspot as evolutionary hot-bed: spectacular radiation of *Erica* in the Cape Floristic Region. *BMC Evolutionary Biology*, **16**, 190.

- Price, R. A. & Palmer, J. D. (1993) Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geraniales from rbcL sequence comparisons. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**, 661–671.
- Ridley, H. N. (1930) *The dispersal of plants throughout the world*. Kent: Reeve & Co.
- Röschenbleck, J., Albers, F., Müller, K., Weinl, S. & Kudla, J. (2014) Phylogenetics, character evolution and a subgeneric revision of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *Phytotaxa*, **159**, 31–76.
- Shmida, A. & Ellner, S. (1983) Seed dispersal on pastoral grazers in open Mediterranean chaparral, Israel. *Israel Journal of Botany*, **32**, 147–159.
- Stamp, N. E. (1989) Seed dispersal of four sympatric grassland annual species of *Erodium*. *Journal of Ecology*, **77**, 1005–1020.
- Touloumenidou, T., Bakker, F. T., Marais, E. M. & Albers, F. (2004) Chromosomal evolution interpreted from the rDNA ITS phylogeny for *Pelargonium* section *Hoarea*. *Biodiversity and Ecology*, **2**, 93–106.
- Valente, L. M., Savolainen, V., Manning, J. C., Goldblatt, P. & Vargas, P. (2011) Explaining disparities in species richness between Mediterranean floristic regions: a case study in *Gladiolus* (Iridaceae). *Global Ecology and Biogeography*, **20**, 881–892.
- Weng, M. L., Ruhlman, T. A., Gibby, M. & Jansen, R. K. (2012) Phylogeny, rate variation, and genome size evolution of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**, 654–670.
- Will, M. & Claßen-Bockhoff, R. (2014) Why Africa matters: evolution of Old World *Salvia* (Lamiaceae) in Africa. *Annals of Botany*, **114**, 61–83.
- Zeide, B. (1976) Dispersal patterns in *Erodium hirtum* Willd. *Israel Journal of Botany*, **25**, 221–224.

CAPÍTOL 2

**Opposite trends in the genus *Monsonia*
(Geraniaceae): specialization in the African deserts
and range expansions throughout eastern Africa**

Abstract

The African Austro-temperate Flora stands out by its important species richness. A distinctive element of this flora is *Monsonia* (Geraniaceae), mostly found in the Namib-Karoo but also in the Natal-Drakensberg, the Somalian-Zambezi and the Saharo-Arabian regions. Here, we reconstruct the evolution and biogeographic history of *Monsonia* based on several markers, and examine the role of morphological and niche evolution in its diversification using species distribution modeling and macroevolutionary models.

Our results indicate that *Monsonia* first diversified in the Early Miocene c.21 Ma, coinciding with the start of desertification in southwestern Africa. An important diversification occurred c. 4–6 Ma, after a general cooling trend in western South Africa and the rising of the Eastern African Mountains. The resulting two main lineages of *Monsonia* are constituted by: (1) Namib-Karoo succulents, and (2) herbs of the Natal-Drakensberg plus three species that further colonised steppes in north and eastern Africa. The highest diversity of *Monsonia* is found in the Namib-Karoo coastal belt, within a mosaic-like habitat structure which encloses fine-scale climatic gradients. Diversification was likely driven by biome shifts and key innovations such as water-storing succulent stems and anemochorous fruits. In contrast, and unlike other arid-adapted taxa, all species of *Monsonia* share a C₃ metabolism.

1. Introduction

The African Austro-temperate Flora (AAF) is characterized by high species richness and levels of endemism, and constitutes one of the world's richest areas in plant diversity (Cowling & Hilton, 1997; Linder, 2014). Geographically, the AAF includes the Cape region, the Natal-Drakensberg and the Namib-Karoo region, the latter harbouring an extraordinarily diverse arid flora. Several studies have linked the remarkable plant diversity levels found in the AAF to the presence of recent radiations (Richardson, 2001) and resilience in older lineages (Cowling & Lombard, 2002), suggesting a complex evolutionary pattern (Linder, 2005; Verboom *et al.*, 2009). Patterns of diversity in the AAF have been alternatively linked to abiotic or biotic factors, including climate gradients, topographical complexity, niche subdivision, and the appearance of morphological novelties or key innovations (Schnitzler, 2011; Valente & Vargas, 2013).

The Neogene history of Africa is one of aridification and desertification. Waves of drought, interspersed with periods of more humid climate, have profoundly impacted the vegetation composition of this continent from a former subtropical “Gondwanan” flora to one dominated by arid and semiarid elements (Pokorny *et al.*, 2015). The Cenozoic northeastward drift of the continent towards the equatorial zone, the uplift of Eastern Africa starting in the Eocene, and the closing of the Tethys Sea after the collision with Eurasia, are some of the main causes behind this aridification trend (Plana, 2004; Senut *et al.*, 2009). A major aridification episode began in the early Miocene (c. 17 Ma), in the Namib and Kalahari deserts (Senut *et al.*, 2009), followed by other drought events in the Namib-Karoo, the Sahara and the Eastern Arc Mountains in the later Miocene (8–9 Ma; Sepulchre *et al.*, 2006; Pokorny *et al.*, 2015). Aridification in the Namib Desert climaxed with the upwelling of deep waters, the Benguela Current c. 8–10 Ma (Siesser, 1980). The hyper-arid Namib Desert stretches from southern Angola through Namibia into South Africa (i.e. the Succulent Karoo) with a variable width (80–200 km) and gradual rise from the coast to the Namib Escarpment. These climate changes generated a wealth of new habitats across south-western Africa,

and triggered speciation in drought-tolerant geophytes, succulents, and species with CAM/C₄ metabolism (Cowling & Hilton, 1997; Linder & Hardy, 2004).

Orogenic events also impacted biodiversity; for example, the main uplift of the Drakensberg Mountains at the Miocene-Pliocene boundary (5.5 Ma) coincided with an increase in diversification rates in certain groups (Bentley *et al.*, 2014). The uplift of the East African Rift System during the Plio-Pleistocene also underlies diversification rate shifts in other groups (Senut *et al.*, 2009; Hoetzel *et al.*, 2015). Between these mountain ranges and the West-Central Guineo-Congolian region there is the “African Arid Corridor” (AAC) or the “Arid Track”, a 1000 Km-wide arid corridor that connects South Africa with other regions, such as the Great Rift, the North African savannahs and the Sahara Desert (Bellstedt *et al.*, 2012).

The genus *Monsonia* is a medium sized genus (39 species) mostly distributed in the AAF, with considerable variation in ecological requirements and life forms (annuals, perennials and succulents). *Monsonia* species are adapted to two major habitat types: 1) arid and hyper-arid habitats, and 2) grasslands, mountain meadows, fynbos, savannahs, and disturbed habitats. The desert-adapted species are either rhizomatous perennials that accumulate water in their rhizomes during dry periods, or succulent perennials that store it in their stems. Some desert species present a reduced foliar surface and stomas, which may close during the day. Grassland species are perennial rhizomatous herbs, and less frequently, annuals. Most species exhibit geographically restricted distributions along the coastal belts of the Succulent Karoo and the Namib regions. Four widespread species (*M. senegalensis*, *M. angustifolia*, *M. heliotropioides* and *M. nivea*) extend their ranges into grasslands and savannahs of north and east Africa. Globally, *Monsonia* is distributed in five main areas: i) the Namib-Karoo deserts and semi-deserts, (17 endemics), ii) the Cape region (5 endemics), iii) the Natal-Drakensberg area (7 endemics), iv) seasonally arid Somalian and Zambebian Floras (2 endemics), and v) the Saharo-Arabian arid Flora (2 endemics) (Figs. 1 & 2). Up to 84.6% of *Monsonia* species are endemic to one of these areas (Fig. 1).

As mentioned above, species of *Monsonia* are characterized by a variety of root types and stem arrangements to maximize productivity in water-limited

habitats (i.e., by buffering water availability (Venter, 1979; Moffett, 1979, 1981). In other succulent African plants (e.g., *Pelargonium*), measurement of carbon isotope ratios has indicated a flexible C₃ photosynthesis, with plasticity between CAM and C₃ metabolism (Jones *et al.*, 2013). So far, only two species of *Monsonia* have been studied for CO₂ fixation patterns (using $\delta^{13}\text{C}$ method), *M. mossamedensis* and *M. crassicaule*, suggesting a C₃ metabolism (Mooney, 1977; Rundel *et al.*, 1999). Thus, one hypothesis is that changes in life form (succulence, annuals) and metabolism type (C₃, CAM) drove species diversification of *Monsonia*, enabling the colonisation of novel biomes, such as arid and semi-arid (grasslands) environments that became dominant in the Late Miocene. Restricted gene flow among populations has also been posited as explanation for the high plant diversity levels in the Namib-Karoo region (Goldblatt *et al.*, 1995), which might also apply to *Monsonia*, given the restricted distributions of many species.

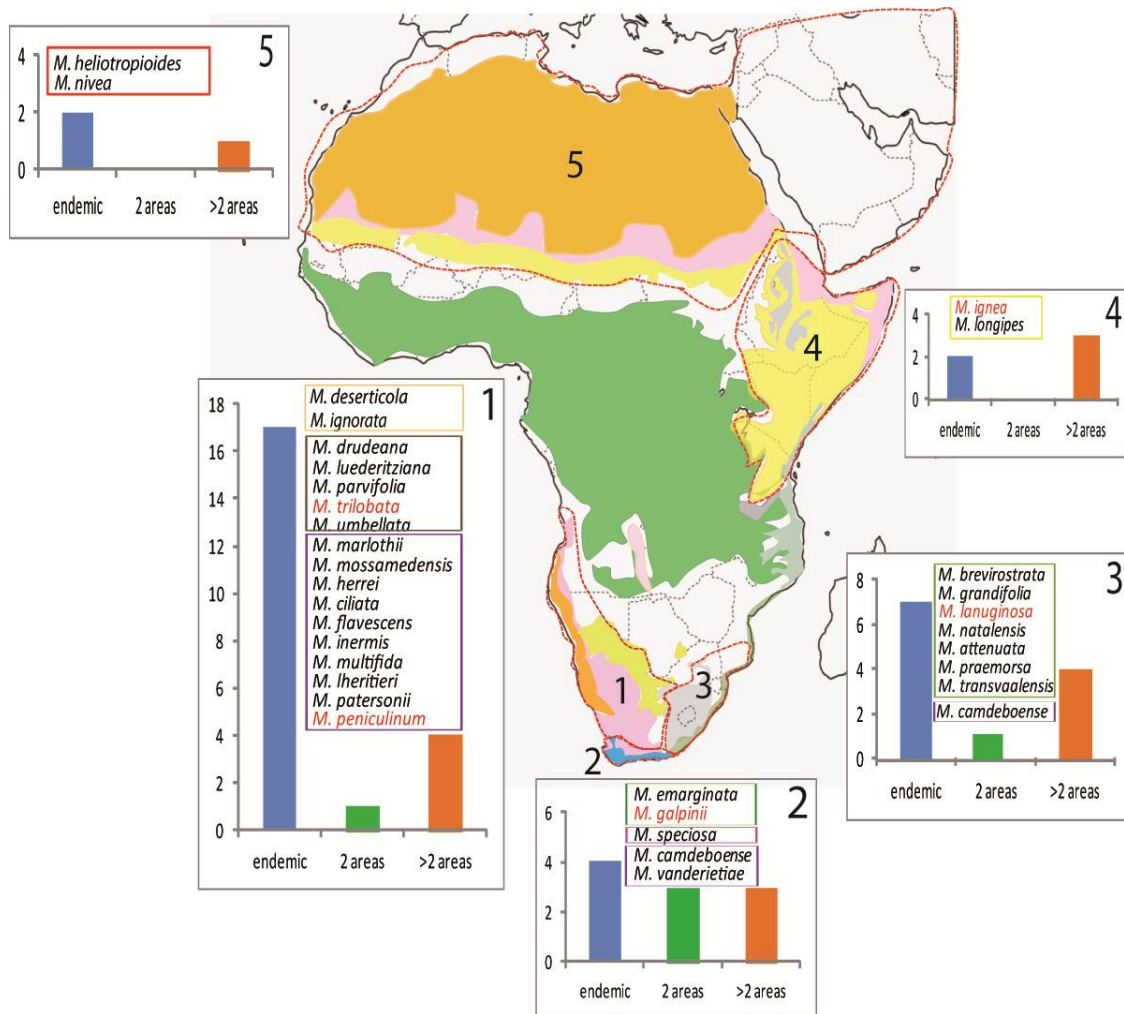


Figure 1. Distribution of species of *Monsonia* in five endemism areas in Africa. Colours indicate the main vegetation zones. The information was obtained from Wikipedia, Plana, 2004 and Senut *et al.*, 2006. Names in red indicate species not sampled in this work. The graphics show the number of endemics (blue bar), species shared with another area (green bar), and widespread species (i.e., occurring in more than two areas, orange bar). The coloured square with a letter indicates the phylogenetic adscription of each species (see Figure 2).

In this study, we used a nearly complete taxon sampling and molecular markers from the plastid and nuclear genome to reconstruct phylogenetic relationships, divergence times, ancestral geographic ranges and climatic niches in order to understand the evolutionary origins of species richness and diversity patterns in genus *Monsonia*. Adaptive radiations have often been linked to “key innovations” –the appearance of morphological novelties enabling a lineage to colonize a new environment– and “key opportunities”, events of niche evolution that drive rapid speciation through ecological release (Linder, 2005). With its

variety of life forms and adaptations to water drought, and its presence in both arid habitats and other semi-arid ecotypes, such as grasslands, mountain meadows, and fynbos, *Monsonia* represents an ideal group to examine the relative contribution of these two evolutionary mechanisms (key innovations and ecological evolution) in the diversification of the AAF flora. Additionally, it also offers the opportunity to examine the role played by (biome) niche evolution versus niche conservatism (adaptation to arid environments) in the evolution of the African arid flora and the origins of the Arid Track.

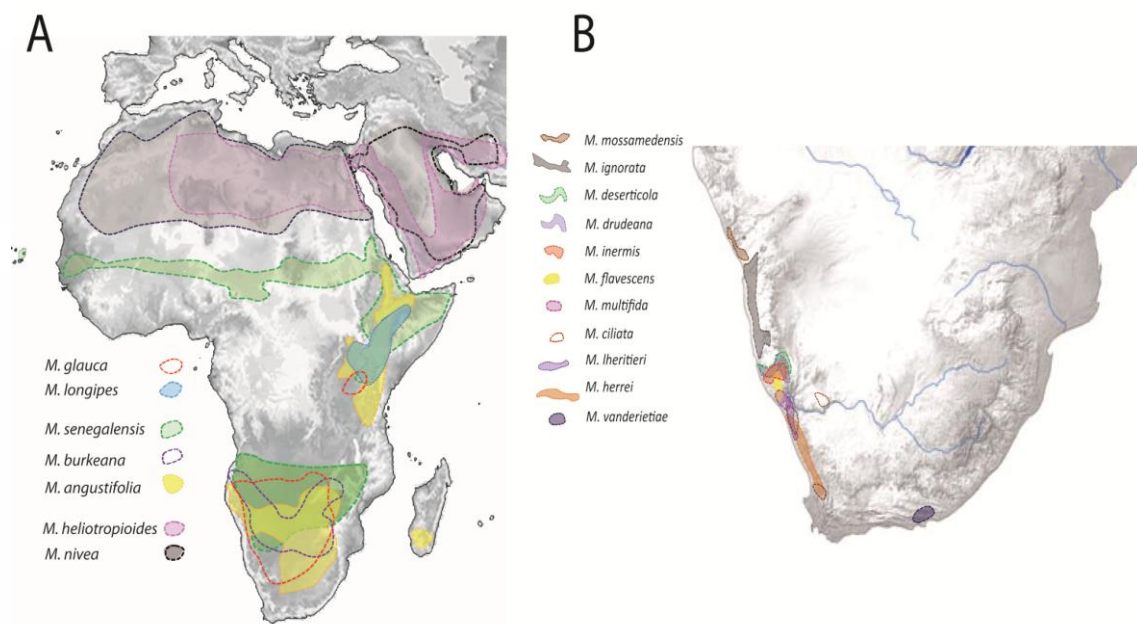


Figure 2. Main types of distribution in *Monsonia* species: (A) species with extensive distributions across the eastern corridors or in North Africa plus Arabia and western Asia (subclades a, c and f); (B) species restricted to small areas in the coastal Namib, the Succulent-Karoo and other parts of Southern Africa (subclades b, d and g).

2. Materials and Methods

2.1. Study group and taxon sampling

To clarify phylogenetic relationships within *Monsonia*, 34 species out of a total of 39 were sampled (Table S1), representing 87.2% of all species currently included in the genus. We included representatives of all other genera of Geraniaceae as outgroups, and *Hypseocharis* (Hypseocharitaceae) as a more distant

outgroup (Fiz *et al.*, 2008; Palazzesi *et al.*, 2012; Systma *et al.*, 2014). We compiled an extensive dataset of distribution records, from the entire distributional range of *Monsonia* using data from literature, herbarium specimens, and our own fieldwork (Table S2).

2.2. DNA sequencing

Total DNA was extracted from silica gel-dried plant tissue using the 'DNeasy Plant Mini Kit' (QIAGEN Inc., California, USA) according to manufacturer's instructions. To reconstruct phylogenetic relationships within *Monsonia*, four variable cpDNA regions were sequenced: *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *matK5F-C2MR*, and *rbcL1F-rbcL724R* producing a total of 107 new sequences (Table S1). We also sequenced the nuclear ribosomal marker ITS, producing a total of 11 new sequences. For details on PCR amplification and sequence alignment see Supplementary Information and Table S3. Sources of the material examined, location of vouchers, GenBank accession numbers, and full references are listed in Table S1.

2.3. Phylogenetic dating, diversification analyses, and biogeographic inference

Phylogenetic relationships and divergence times were estimated with relaxed molecular clocks implemented in the software BEAST v. 1.7.5 (Drummond & Rambaut, 2007). Based on the dating analyses of Sytsma *et al.* 2014, we used two secondary age constraints to calibrate: a) the split between *Hypseocharis bilobata* and the other taxa (i.e., the root node), and b) the split between *Pelargonium* and *Monsonia*. We used normal prior distributions representing the mean and 95% high posterior density (HPD) credibility intervals: (48 ± 2.5 Ma, and 36 ± 3.0 Ma, respectively) to account for the uncertainty in the original estimates. To identify shifts in diversification rate in the genus, we used BAMM v. 2.2.0 (Bayesian Analysis of Macroevolutionary Mixtures; Rabosky *et al.*, 2014). We accounted for incomplete taxon sampling in our dataset by providing global sampling

proportions detailing a general proportion of missing taxa of 0.1, and used a conservative 0.1 value for the Compound Process Prior. Our input tree was the MCC chronogram generated from BEAST. This method has been criticized recently for incorrect modelling of rate shifts at unobserved/extinct lineages and improper priors (Moore *et al.*, 2016), so results should be taken with caution; see however Rabosky *et al.* (2017) for a rebuttal.

Spatio-temporal evolution was inferred using the Dispersal–Extinction–Cladogenesis model (DEC; Ree & Smith, 2008) implemented in the R package *BioGeoBEARS* (Matzke, 2014). We defined four geographic areas as operational units: (1+2) Namib-Succulent Karoo plus Cape Floristic Region; (3) Natal-Drakensberg (South-eastern Africa); (4) East Africa; (5) Sahara Desert + Arabian Peninsula (Fig. 3).

2.4. Species distribution modelling, niche quantification and climatic niche evolution

Species distribution modelling (SDM) was performed to estimate the potential distributions of *Monsonia* under current climatic conditions. The occurrence dataset included 1118 localities of 34 species of *Monsonia*, compiled from herbarium specimens and our own collections (Tables S1 & S2). In order to explore the bias that may be caused by the presence of point endemics beside widespread species with large niche breadths, we followed two approaches: 1) we first analysed the 1118 records covering the entire range of the 34 species, and second, and 2) we analysed only the 800 records of the 24 South African species. Then, we used 20 eco-climatological variables in 30 arc-seconds, which were clipped i) for the whole distribution area of *Monsonia*, or ii) for species distributed only in South Africa (Tables 4 & 5).

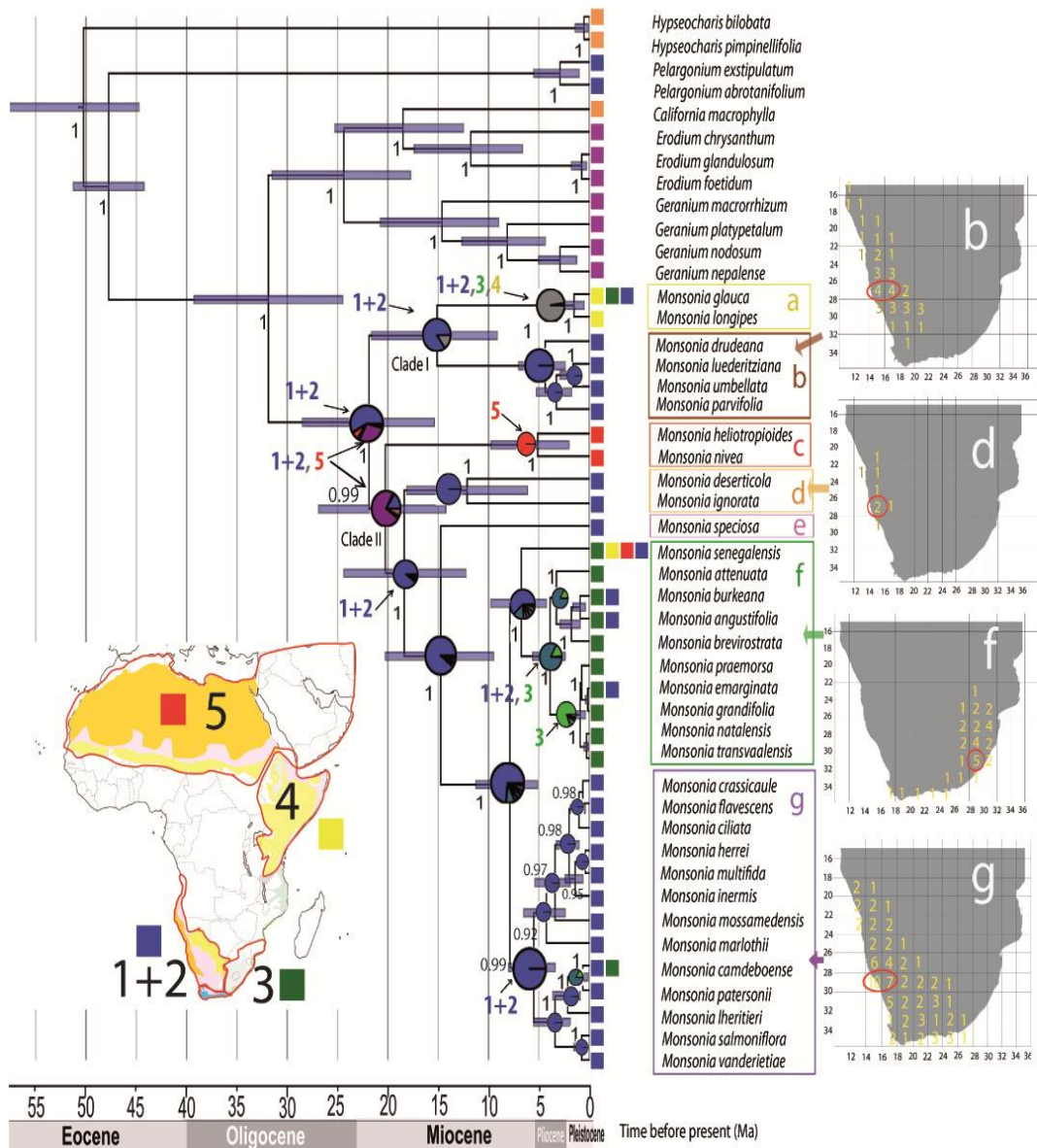


Figure 3. Maximum clade credibility (MCC) tree from the BEAST analysis of plastid and nuclear markers with ancestral areas reconstructed using (DEC). Areas are: blue) Namib-Karoo plus the Cape (1+2); green) Natal-Drakensberg (3); yellow) eastern Africa (4); red) Sahara, Arabia and W Asia (5); orange) America; purple) Eurasia. Maps on the right indicate the number of endemic species ascribed to each clade by grid cell of 2° of latitude x 2° longitude.

We tested niche similarity between all pairs of species using the metric *D* (Schoner, 1968) as implemented in the program ENMtools v. 1.0 (Warren *et al.*, 2010), and a measure derived from the Hellinger distance called *I* (Warren *et al.*, 2008). We included the identity test *I* to determine if the distribution models of two species differ in their niche by pooling the locality data for both species and sampling randomly from the pooled occurrences to create pseudoreplicate

datasets (100 pseudoreplicates in our analyses) of equal size. The niche breadth was measured using the ‘inverse concentration’ metric in ENMTools.

We assessed the evolution of the individual climatic variables through ancestral state reconstruction methods implemented in the R package *phytools* v. 0.3-93 (Revell, 2012). The MCC tree obtained from the concatenate dataset was used to study the evolution of the climatic niche with four variables: the annual mean temperature, the annual mean precipitation, the aridity index and the highest weekly moisture index. We chose these variables or climatic traits because they retained an important part of the variance in the principal component analyses (PCAs). We calculated the mean value for each of the four variables per species and conducted maximal likelihood (ML) ancestral state inference with four models of continuous trait evolution: BM (Brownian model, random drift), OU (Ornstein–Uhlenbeck model, a selective-adaptive model), White Noise (lack of phylogenetic signal), and Early Burst (deceleration of BM variance). To infer the evolution of the occupation of habitat types, we also used the aridity index (available at: <http://www.cgiar-csi.org/data/global-aridity-and-pet-database>). Models were compared by using the corrected Akaike information Criterion (AIC_c) for small sample sizes, as implemented in the R package *geiger* v. 2.0.6 (Harmon *et al.*, 2008). The Ornstein–Uhlenbeck (OU) model of evolution was selected as the best-fit model for all variables. We used then the function *anc.ML* in *phytools* to infer ancestral character states at each node in the phylogeny under the OU model, and the function *cont.Map* to plot these continuous character traits onto the phylogeny (Revell, 2012, 2013).

2.5. Evolution of morphological traits

To infer the evolution of the habit and the dispersal type (discrete characters), we reconstructed the ancestral states using the Bayesian approach described by Pagel *et al.* (2004) and Pagel & Meade (2006), as implemented in *BayesTraits* v. 2.0 (Pagel & Meade, 2014), on the posterior tree sample of the BEAST analyses. The character habit was divided into three states: herbaceous

annual, herbaceous perennial and succulent; for the fruit dispersal type, we considered two states: plumose (anemochorous) and barbate (trypanocarpic) mericarps (Tables S2 & S6). All representatives of *Monsonia* produce mericarps with hairs on the inner part of the awn: these present similar lengths over the awn in the “plumose” mericarps, but long in the lower part and short or absent in the upper part in the “barbate” mericarps (Touloumenidou *et al.*, 2007). Awns, mericarp bodies, and awn hairs were measured with a caliper using ten different mericarps per locality. Also, the buoyance ability of mericarps was tested following the Maddox & Carlquist (1985) method. In the BayesTraits analyses, we assumed an exponential prior with the mean drawn from a uniform hyperprior on the interval 0 to 10. The MCMC run for 10^8 generations, sampling every 1000th generation. The first 10^7 generations were discarded as burn-in. The value of the *ratadev* parameter was set so that the MCMC acceptance rate was between 20 and 40%. Each analysis was conducted three times, and similar harmonic mean likelihoods indicated that the MCMC chain had converged.

To test whether there is a correlation between the niche aridity and the different types of habit and dispersal syndromes of *Monsonia*, we performed the phylogenetic generalized least squares analyses (PGLS; Martins & Hansen, 1997), using the *gls* function and the *corBrownian* and *corPagel* correlations in the R packages *nlme* and *geiger* (Harmon *et al.*, 2008). PGLS regressions consider the phylogenetic structure in order to estimate the correlation between two or multiple traits. We implemented this analysis with the package *geiger* because it allows the possibility of choosing the evolution model (for instance BM or OU).

2.6. Photosynthetic metabolism: carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$)

To detect evidence for carbon concentrating mechanisms, we conducted a broad screening of carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$) in *Monsonia*. The two major carbon fixing enzymes RuBP carboxylase and PEP carboxylase fractionate the stable isotopes of carbon, 12 and 13, differently (Smith & Epstein, 1971), resulting in ranges of -22‰ to -33‰ typical of C_3 species and -9‰ to -18‰ typical of C_4

species and obligate CAM species (Pierce *et al.*, 2002). Signature $\delta^{13}\text{C}$ values for typical CAM plants typically range from -20‰ to -10‰, whereas $\delta^{13}\text{C}$ values for typical C_3 plants range from -33‰ to -22‰ (O’Leary, 1988). Intermediate $\delta^{13}\text{C}$ values (-18‰ to -22‰) might indicate a significant proportion CO_2 fixation at night (Pierce *et al.*, 2002) or simply long term stomatal closure (Von Caemmerer, 1992). The carbon isotope ratio of c. 2 mg samples from adult leaves was measured using isotope ratio mass spectrometry (Smith & Epstein, 1971). Samples were analysed with a mass spectrometer at the Institut für Geowissenschaften, University Mainz, Germany. The $\delta^{13}\text{C}$ values were calculated according to the method of Craig (1957) and the results expressed as $\delta^{13}\text{C}$ with respect to the PDB standard.

3. Results

3.1. Phylogeny, diversification analyses and biogeographic reconstructions

Divergence times estimates inferred with BEAST v. 1.7.5 on the concatenated partitioned plastid-nuclear dataset (Fig. 3; Drummond & Rambaut, 2007) showed two primary clades that diverged c. 21.8 Ma (95% HPD 28.6–15.2): Clade I, comprising one subclade (a) with two grassland species: *M. glauca* and *M. longipes* and a second subclade (b) integrated by four desert species: *M. luederitziana*, *M. parvifolia*, *M. umbellata* and *M. drudeana*. The two subclades separated c. 15 Ma (CI 22.4–9.8). Clade II is larger and includes several nested subclades: subclade (c) separated c. 20 Ma (CI 27.1–14.8) is formed by two drought-tolerant Saharo-Arabian rhizomatous herbs (*M. nivea* and *M. heliotropioides*); subclade (d) comprises two Namibian drought-tolerant, coastal herbs: *M. deserticola* and *M. ignorata*; subclade (e) includes only *M. speciosa*, in the Cape dry-meadows; the next group forms a larger core with two smaller subclades that split 7.5 Ma (CI 5–11.7), one of several perennial and annual herbs (subclade f); and another comprised of succulents (subclade g, *M. subg. Sarcocaulon*). All subclades were recovered by both the nuclear and plastid datasets, except for the position of subclade (d) (*M. deserticola* and *M. ignorata*), which in the nuclear

dataset appears as sister to subclades (a) and (b) (Figs. S1 & S2). Divergence of *Monsonia* from sister-group (*Pelargonium*) was dated in the Late Eocene-Early Oligocene (c. 30 Ma). *Monsonia* crown-age (the split between Clade I and II) was inferred in the Early Miocene (22 Ma; CI 15.2–28.6), with divergence of main subclades dated in the Early-Mid Miocene period (15–20 Ma). The main exception is the split between the species-rich subclades (f) and (g), which is dated in the Late Miocene (c. 5–12 Ma).

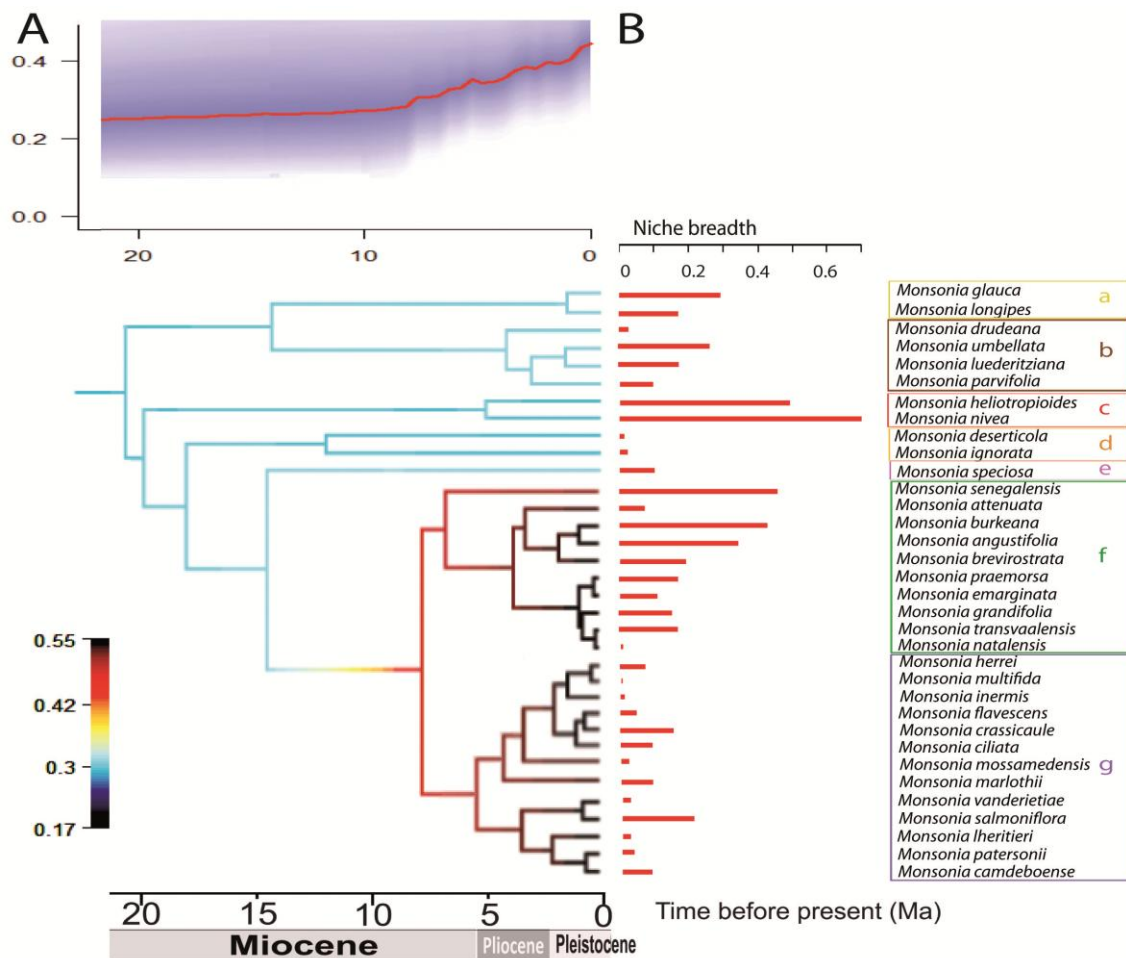


Figure 4. (A) Diversification rate through time and Bamm phylorate plot showing changes in net diversification rates across branches on the MCC tree. (B) Niche breadth for each species obtained with ENMtools.

DEC biogeographic analysis on the BEAST maximum clade credibility (MCC) tree (Fig. 3) reconstructed the Namib-Karoo-Cape (areas 1+2) as the most likely origin for the ancestor of *Monsonia*, with a widespread range comprising the

Namib-Karoo-Cape (areas 1+2) and the Saharo-Arabian deserts (5) inferred as the second most likely. The ancestor of Clade I (subclades a-b) originated in the same region: the deserts of South Africa followed by a dispersal event to the Great Rift. Clade II (subclades c-g) presents a more complex colonisation history: the ancestor was probably widely distributed in the Namib-Karoo-Cape and Saharo-Arabian deserts, while all descendant lineages showed a narrower distribution either in the Saharo-Arabian deserts (subclade c) or in the Namib-Karoo-Cape (subclades d-g). Within subclade (f) an event of range expansion into the Natal-Drakensberg was reconstructed. Diversification rate analyses in BAMM suggested a significant acceleration in diversification rates at the most-recent common ancestor of subclades (f) and (g) at the Pliocene-Miocene boundary (Fig. 4).

3.2. Species distribution models, niche breadth and overlap

We obtained SDMs with high predictive accuracy for all species, according to the AUC criterion (Area under the receiver operating curve). The predicted current distribution was also consistent with the known distribution range of each of the 34 species analysed (Fig. 5). The Principal Component Analysis (PCA) of the complete *Monsonia* dataset (Fig. 5) captured c. 84.5% of the variance in the first three components (PC1: 41.1%, PC2: 28.0%, PC3: 15.4%) (Table S4), and divided *Monsonia* species along the first axis (PC1) into those growing in warmer habitats (such as the northern African savannahs and deserts), and those inhabiting cooler ecotypes, such as the Drakensberg Mountains and the Namib coastal belt. The second axis PC2 divided the arid-adapted species from those growing in grasslands and other (relatively) wetter environments (Fig. 5). In total, three major groups were recovered (Fig. 5): a group of species growing in the Sahara Desert (subclade c), the group of Namib-Karoo species (subclades b, d, e, g), and a heterogeneous group formed by species from the savannahs, steppes and grasslands (subclades a, e, and f). *Monsonia speciosa* (Cape region) appears in both the second and third groups (Fig. 5).

The PCA of the reduced dataset, including only the 24 South African species (Fig. 6) captured c. 80.4% of the variance in the first three components (PC1: 33.5%, PC2: 30.3%, PC3: 16.6%; Fig. 6, Table S5). This analysis also resulted in significant differentiation under the ANOSIM test ($p < 0.01$) and the average AUC. The test values of the nine-variables models for the studied lineages were > 0.9 . The PCA plot (Fig. 6) shows the species divided into three subplots: the first includes the species in subclade (g) (succulents); the second shows those in subclades (b) and (d) (desert herbs), while the third represents species included in subclade (f) (grassland herbs). The first axis was mostly correlated to Bio29 (highest weekly moisture index), Bio18 (precipitation of the warmest quarter) and relative humidity, and separated the species included in the Namib-Karoo-Cape group from those of the Natal-Drakensberg group. The second axis was significantly correlated to Bio18 (precipitation of the warmest quarter), and divided the Natal mountain species from the lowland ones. Finally, the third axis was correlated to Bio5 (maximal temperature of the warmest week), and discriminated between the coastal specialists and species growing in the coast and the inner parts of the Namib-Karoo-Cape within subclades (b), (d) and (g) (Fig. 6).

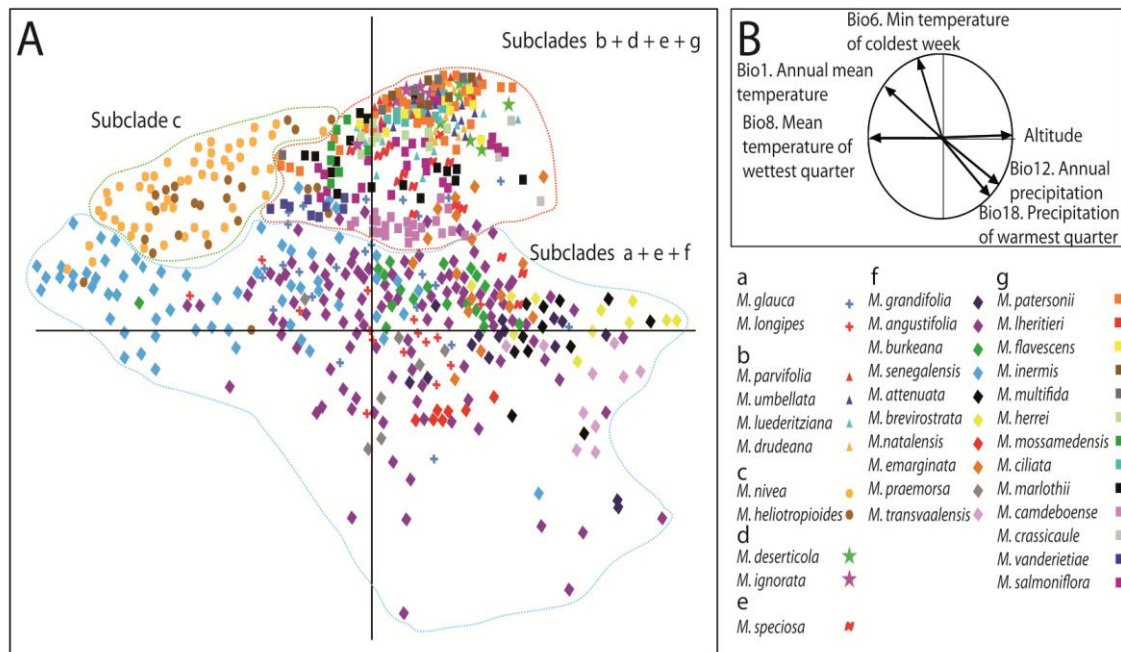


Figure 5. Niche analyses showing the results of the PCA for the complete dataset including the 34 *Monsonia* species analysed (each species is labelled with a different symbol). The analysis was performed with nine variables that captured c. 69% of the variance in the first two components

(PC1: 41.1%, PC2: 28.0%). A) PCA of all 34 *Monsonia* species. B) Weight of the variables in the PCA analysis. Symbols are: a) *M. gr. longipes* (red and blue crosses), b) *M. gr. umbellata* (triangles), c) *M. gr. nivea* (yellow and brown spots), d) *M. gr. deserticola* (green and pink stars), e) *M. speciosa* (red N), f) *M. gr. attenuata* (diamonds), and g) *M. gr. Sarcocaulon* (squares).

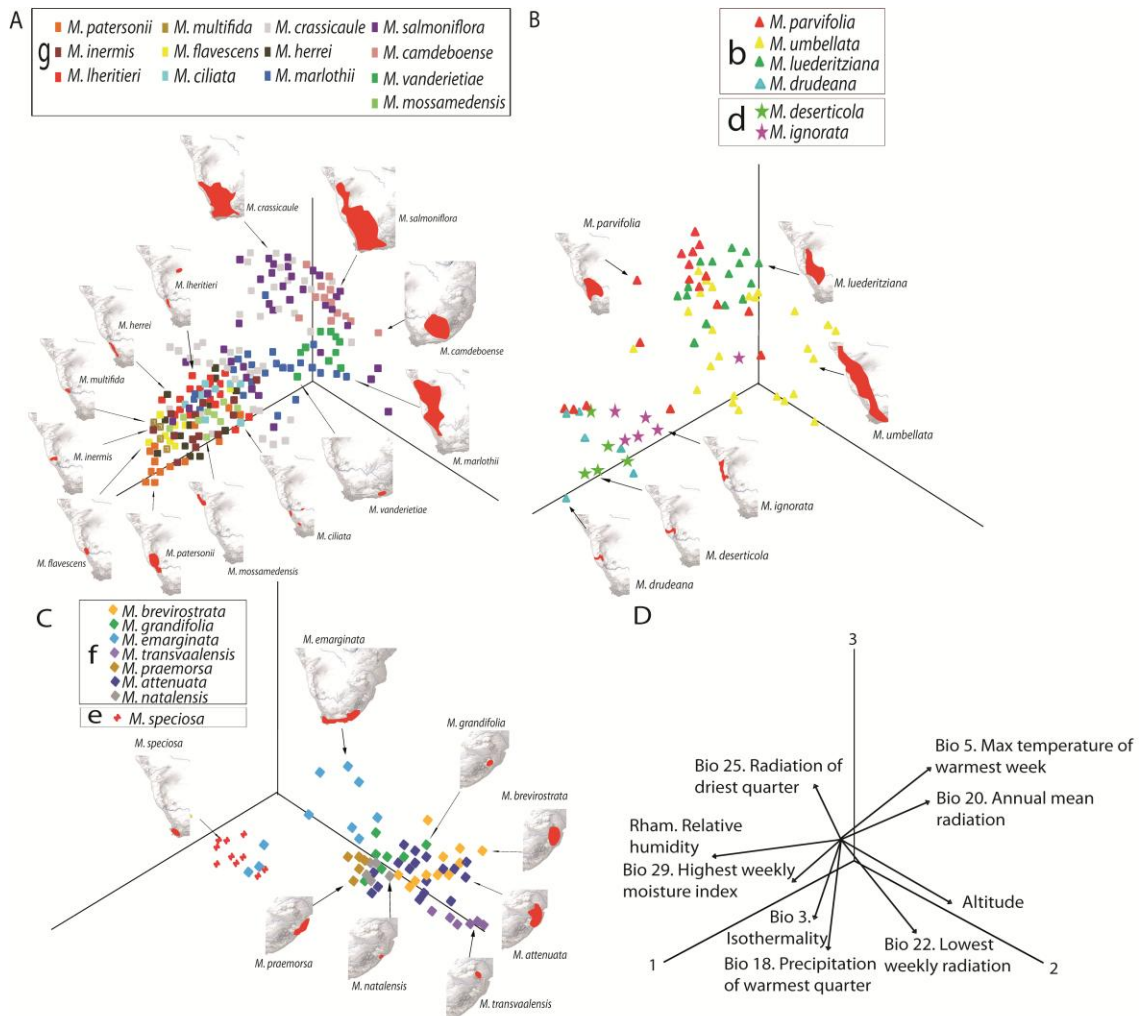


Figure 6. Niche analyses showing the results of the PCA for the reduced dataset, comprising only the South African species (each species is labelled with a different symbol). The analysis was performed with nine variables that captured c. 83% of the variance in the first three components (PC1: 33.5%, PC2: 30.3%, PC3: 16.6%). A) *Monsonia* subg. *Sarcocaulon* (subclade g in Fig. 3). B) *Monsonia* gr. *umbellata* (triangles) and *M. gr. deserticola* (stars) (subclades b and d in Fig. 3). C) *Monsonia* gr. *attenuata* (diamonds) and *M. speciosa* (red crosses) (subclades e and f in Fig. 3). D) Weight of the variables in the PCA.

Pairwise comparisons of niche overlap among South African species are presented in Table S7. Values ranged from $D = 0.009$ (*M. vanderietiae* versus *M. deserticola*) to $D = 0.832$ (*M. parvifolia* versus *M. luederitziana*). In general, niche

overlap among taxa was moderate to low, according to the classification of Rödder & Engler (2011), even between close relatives ($D < 0.5$). Moreover, niche-identity and niche-overlap tests showed that the highest overlap and similitude occurred between non-sister species included within subclades (g) and (b). In contrast, niche overlap among species for the remaining clades was marginal. The highest overlap values ($D > 0.7$) observed between two pairs of species belonging to the same subclade were $D = 0.792$ for *M. ciliata*-*M. herrei* (subclade g) and $D = 0.832$ for *M. parvifolia*-*M. luederitziana* (subclade b). In other cases, high niche overlap was observed between species belonging to different subclades, especially in species of the Namib coastal regions, for instance $D = 0.723$ between the herbaceous *M. drudeana* (subclade b) and the succulent *M. flavescens* (subclade g) (Table S7).

Niche breadth values for the complete dataset analysis are presented in Table S8 and Figure 4. *Monsonia nivea* exhibited the widest climatic niche (0.690), followed by *M. heliotropioides* (0.4933), *M. senegalensis* (0.4529), *M. burkeana* (0.4436), and *M. angustifolia* (0.354). The remaining species showed narrower niche breadths. The lowest values were found in Namib-Karoo coastal species such as *M. multifida* (0.0086), *M. inermis* (0.0149), *M. lheritieri* (0.0209), *M. drudeana* (0.0238) or *M. deserticola* (0.0299).

3.3. Niche evolution

Terminal and ancestral estimates of mean values of the aridity indexed [inferred using the (adaptive) Ornstein–Uhlenbeck continuous evolutionary model] are plotted on the MCC phylogenetic tree in Figure 6, and for the other selected bioclimatic variables, aridity, precipitation, humidity and temperature (Figs. 7, S3, S4 & S5). The reconstruction of niche occupancy through time revealed that the ancestral condition for the genus *Monsonia* was mean-high aridity (Fig. 7). This analysis also shows three major shifts into the semiarid or wet biomes within subclades (a), (e) and (f) (Fig. 7). Evolution of climatic preferences towards high precipitation and moisture were found in subclades (a), (e), and (f), corresponding

to the Great Rift, Cape and Natal-Drakensberg regions. Evolution to low temperatures was found in some species of subclade (f) (*M. attenuata*, *M. grandifolia*), and some Namibian coastal species (e.g., *M. drudeana*, *M. deserticola* and *M. ignorata*, Fig. S5); the opposite pattern was found in *M. senegalensis* and the two species of the Saharo-Arabian deserts (*M. nivea* and *M. heliotropioides*), which evolved preferences towards higher temperatures.

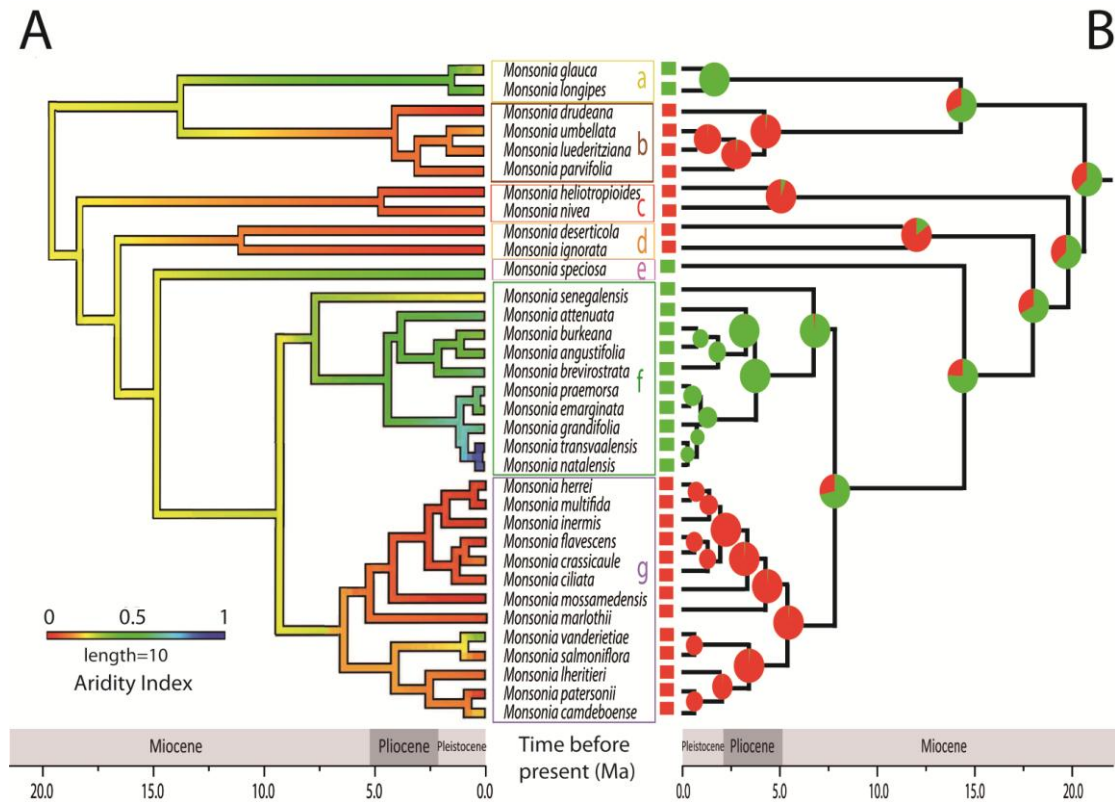


Figure 7. Niche and fruit type evolution. (A) Shifts between arid and semiarid-wet habitats inferred using aridity values in the R package *phytools* (Revell, 2012) with the Ornstein–Uhlenbeck continuous evolutionary model. B) Reconstruction of fruit type evolution using Bayesian ancestral state inference in BayesTraits. Red: plumose; green: barbate. The phylogeny represents the MCC tree from the BEAST analysis (Fig. 3).

3.4. Changes in niche preferences, habit type and dispersal mode

The ancestor of *Monsonia* was reconstructed as an herbaceous annual plant (Fig. 8). Changes in habit or life form can be observed in three species of subclade (f), with evolution to annuality, and all species of subclade (g), which developed succulent stems. These changes were accompanied by shifts in the dispersal mode,

often in the same direction: from anemochorous in arid or hyper-arid biomes to trypanocarpic in wetter ones and viceversa, and at least in one case from herbaceous to succulent in hyper-arid biomes (Fig. 8). In terms of niche breadth, eleven anemochorous species of the Namib-Karoo show very narrow niches and smaller distributions. However, the opposite case was also observed: species of subclade (c) (Saharo-Arabian deserts) and some Namibian species within subclade (b) produce plumose fruits and exhibit considerably larger niches. Our PGLS results suggest a significant correlation between aridity and fruit type ($p < 0.001$; Table S9): species that have plumose fruits occupy more arid habitats, while the opposite can be observed for trypanocarpic fruits. However, niche breadth and fruit type are not correlated ($p = 0.1745$). Results show that there are significant differences between annual and succulent species with respect to niche breadth ($p = 0.0133$), but not between annual and perennial ($p = 0.1917$). Finally, correlation between life form and aridity showed marginally non-significant differences between annual and succulent habits ($p = 0.078$).

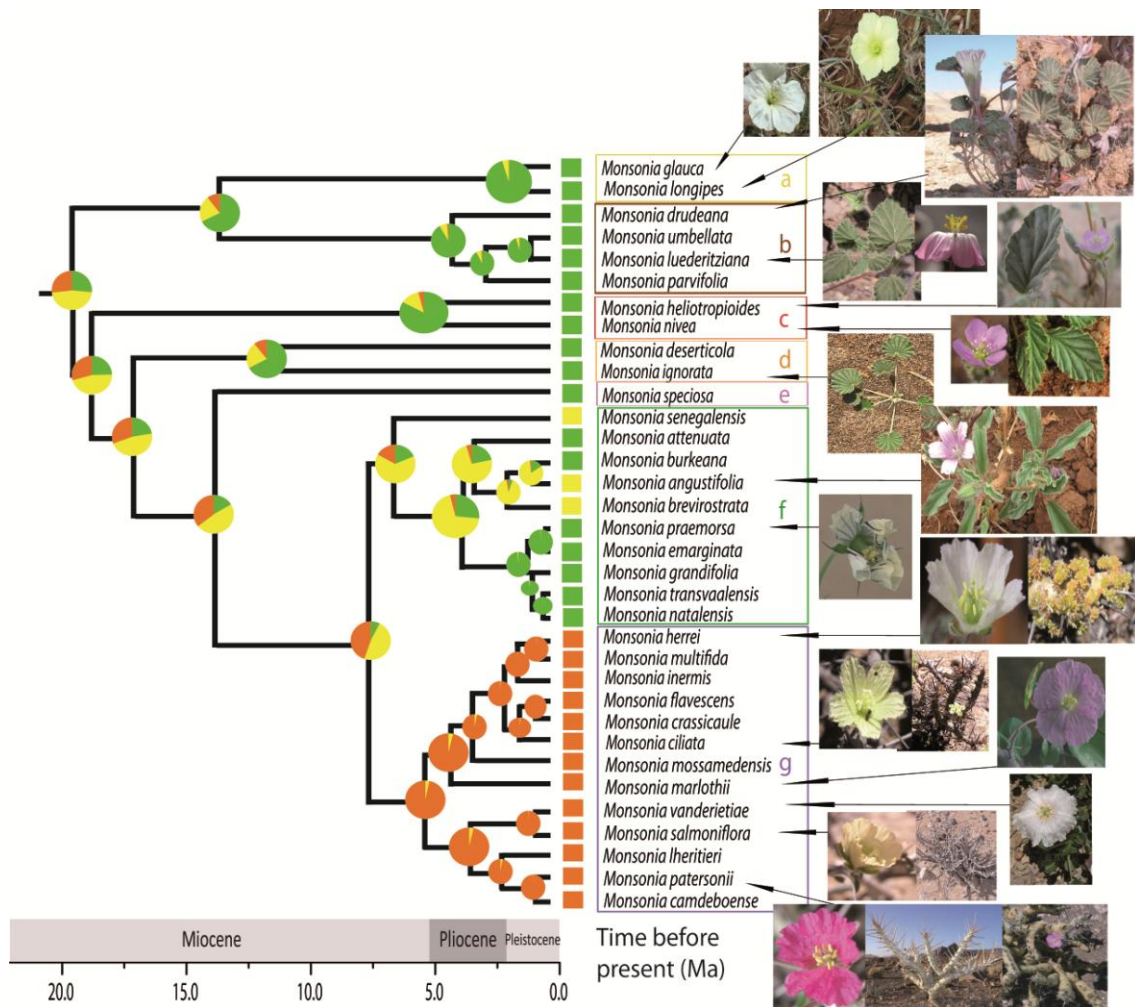


Figure 8. Evolution of the habit type (life form) inferred by Bayesian ancestral state reconstruction (Bayes Traits) over the BEAST MCC tree. Green: herbaceous perennial; yellow: herbaceous annual; orange: succulent perennial. Images of M. Alarcón and J. J. Aldasoro.

3.5. Photosynthetic metabolism: carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$) in *Monsonia*

Carbon isotope ratio measurements for *Monsonia* range from -33.5‰ in *M. nivea* to -22.1‰ in *M. parvifolia* (Table S10), indicating that none of the species exhibits C_4 or CAM photosynthesis with a high proportion of night assimilation (Von Caemmerer, 1992). This also confirms the results of Mooney *et al.* (1977), who described *M. mossamedensis* as a C_3 species (values of -24.5‰ and -26.1‰). The ratio of -18.3‰ published by Rundel *et al.* (1999) is not comparable with ours or Mooney's (1977), since it was calculated differently. Species studied in subclades (c) and (d) (herbaceous, Cape and Namib-Karoo) and subclade (g) (succulents, Cape

and Namib-Karoo) had slightly lower values for this trait than the rest of species. Both leafy and succulent species showed $\delta^{13}\text{C}$ values significantly higher than those typical for CAM and C_4 plants which suggests a C_3 photosynthetic pathway.

4. Discussion

4.1. Aridification, biome range expansions, and the origin of the African Arid Flora

Linder (2014) postulated that the AAF flora originated and diversified in Africa, but that it also included some Australian and Eurasian elements. In his view, there are two arid Floras in Africa: one associated to south-west African coast and the Namib Desert (the “AAF”), and another distributed in the eastern part of the continent, in the Somalia-Masai regional centre of endemism (Linder, 2014). On the other hand, the “Arid Track”, also termed the African Arid Corridor (AAC), has been defined as a pattern connecting the floras of the southwest with the northeast arid regions of Africa (Winterbottom, 1967; Winter, 1971; Pokorny *et al.*, 2015). Bellstedt *et al.* (2012) defined the AAC pattern as the disjunction occurring between Southern Africa and Eastern African-Southern Arabian xeric floristic elements. The limits between this biogeographic pattern and another example of continental-wide disjunction, the Rand Flora (Sanmartín *et al.*, 2010; Mairal *et al.*, 2015), are not clear. Linder (2014) considered the Rand Flora (RF) as an expansion of the AAC to the west. Some RF lineages include succulent plants, adapted to xeric environments (e.g., *Camptoloma*, *Euphorbia balsamifera*), though they never occur in deserts and they exhibit a wider disjunct distribution extending to northwest Africa and Macaronesia. Pokorny *et al.* (2015) considered the RF pattern as a pattern describing a more subtropical or sub-xeric, temperate ancient flora than the AAC. In any case, the origin of the RF and ACC patterns can probably be traced back to the aridification trend that affected the African continent from the Neogene onwards.

Paleoclimate records indicate that desertification in Africa started in the Namib Desert in the Early Miocene and progressed eastward and northwards

(Senut *et al.*, 2009; Pokorny *et al.*, 2015). This temporal pattern fits well our results in *Monsonia*, with the most probably origin of the genus inferred in southwest Africa (the Namib-Karoo region) c. 21 Ma (Fig. 3), where subclade (b) is endemic, and subsequent expansions to the east and north in subclades (a), (c) and (f). *Monsonia* pollen was recorded offshore of Namibia in the cores retrieved at the Ocean Drilling Program (site 1081) in the Tortonian (7.5–9 Ma), but its abundance decreased in the Messinian, and even further during the Pliocene, probably as a consequence of climate aridification (Bentley *et al.*, 2014). Namib species had thus a long-time to adapt to the increasingly arid conditions, and eventually settled in the foggy and cooler habitats of the Namibian coasts. This in turn could have triggered local speciation, and the accumulation of nearly sympatric species in subclade (b) (Fig. 2).

The relatively longer branches and lower speciation rates characterizing the basally diverging subclades (a-e) (Fig. 4A) stand in contrast with the shift towards higher speciation rates inferred in the MRCA of subclades (f) and (g). It is possible that these early diverging clades represented older, less drought-tolerant lineages that escaped from the ongoing aridification by moving north-eastward, for example subclades (a) or (c) (Fig. 3). The stem-age of *Monsonia* (32 Ma, CI 24.8–39.5 Ma, Fig. 3) is in agreement with the Late Eocene-Early Oligocene Climate Cooling event (LEOC, Zachos *et al.*, 2008), which in Africa led to replacement of a subtropical flora by a more arid flora (Plana, 2004). Since desertification during the Neogene advanced from the southwest to the north (Senut *et al.*, 2009), dispersal to the north and east was accompanied by colonisation of wetter habitats or biomes such as savannahs, steppes, and wet forests, and also by an increase in niche breadth (Fig. 4, Table S8). This is the case of the widespread (North Africa) species *M. nivea* and *M. heliotropioides* in subclade (a), but also of *M. senegalensis* in subclade (f), whose range extends northwards into the grasslands and steppes of East Africa (Figs. 2 & 3). The uplift of the Drakensberg Mountains in the Pliocene seems to have facilitated some of these range expansions. Dispersals from the Drakensberg northwards have been reported in several plant groups (Carbutt & Edwards, 2001; Galley *et al.*, 2007). In *Monsonia*, most species in subclade (f) are endemic to these

mountains, but three of them (*M. angustifolia*, *M. burkeana* and *M. senegalensis*) extend their ranges into the grasslands and steppes of southwest and east Africa.

4.2. Ecological divergence and niche specialization explains diversification in Monsonia

The high diversification rates inferred for sister subclades (g) and (f), distributed in the southwest and southeast regions of Africa, seem to represent a young radiation driven by adaptive evolution (Fig. 3). Divergence from their sister-group, *M. speciosa*, was dated c. 14 Ma, after the Mid-Miocene Climate Optimum that initiated a global cooling trend (Zachos *et al.*, 2008), and initial diversification within each subclade ranged from 6 to 4 Ma, following a general cooling trend in western South Africa and the rising of the Drakensberg Mountains in the East. Ancestral niche reconstruction suggests that the initial split between the two subclades (g) and (f) involved "ecological divergence" (niche evolution), the adaptation to different aridity niche values, as shown by the OU model (Fig. 7). Subclade (f) shows adaptation to wetter and colder habitats, whereas the succulent species in subclade (g) are adapted to more arid conditions (Fig. 7). The latter presents species belonging to two "ecological groups": one comprises species of the Namib-Karoo coastal-belt, while another is formed by species distributed in the coastal strip and the Namib-Karoo inner regions (Figs. 3 & 6). Only few succulent species show niche overlap (Table S7), and none of them are sister-species, suggesting that niche conservatism did not play a large role in the diversification of subclade (g). Indeed, this pattern of adaptation to different ecological optima is observed in other subclades in the phylogeny, such as in the divergence between subclade (b) (arid-adapted species) and subclade (a), in which range expansion to the east and north seem to have been accompanied by adaptation to semi-arid and wetter habitats (Figs. 2 & 6).

On the other hand, the reduced niche exhibited by the coastal species in subclade (g) compared to those in other subclades (Fig. 2) seems to have been driven by the constraints imposed by specialization to the hyper-arid and foggy

habitats characteristic of these areas. The vegetation of the coastal belt of the Namib Desert is largely dependent on sea fog generated by the north-flowing Benguela current (Siesser, 1980). The difference in temperature between the cold sea and the warmer inland regions moves the fog mainland, towards the lower pressure points, which makes it condense on small rocks, outcrops and mountain slopes, where a large concentration of biodiversity has been reported (Olivier, 1995; Ellis *et al.*, 2006; Burke, 2013; Valente & Vargas, 2013). Genera such as *Conophytum* (Young & Desmet, 2016), *Portulacaria* (Bruyns *et al.*, 2014), *Hoodia* (Bruyns, 2000), and *Pelargonium* (Martínez-Cabrera *et al.*, 2012) include taxonomic groups with levels of diversity in these habitats comparable to those in *Monsonia*.

Monsonia species exhibit two dispersal syndromes (wind and trypanocarpic) that have favoured the colonisation of different types of habitats. These syndromes are associated to different dispersal abilities and related to distinct ecological niche patterns. *Pelargonium*, the sister genus of *Monsonia*, produces anemochorous fruits. However, ancestral state reconstruction of fruit type evolution suggests that the ancestral fruit type in *Monsonia* is trypanocarpic (Fig. 7). Plumose fruits seem to have evolved independently in subclades (b), (c), (d) and (g) (species of the Namib-Karoo and the Sahara deserts), whereas subclades (a), (e) and (f) (species of the Great Rift, the Cape, the Natal-Drakensberg and other wet or semiarid regions) kept the ancestral condition of non-plumose, trypanocarpic fruits. Our PGLS results also suggest a negative correlation between trypanocarpic fruits and the aridity index, with species exhibiting this type of fruit distributed in less arid habitats. The trypanocarpic dispersal syndrome, in general, is more common in semiarid habitats, while anemochorous species grow preferently in deserts (Van Rooyen *et al.*, 1990). Finally, the succulent life form seems to have evolved only once in the phylogeny (subclade g), likely as a consequence of the adaptation to arid environments in the Namib-Karoo Desert.

Unlike other arid-adapted taxa with a CAM metabolism (Arakaki *et al.*, 2011), all succulent species of *Monsonia* analysed here showed $\delta^{13}\text{C}$ values indicative of a C_3 photosynthetic pathway. This type of photosynthesis has been

reported in other Southwestern African succulents such as Crassulaceae and Aizoaceae (Ripley *et al.*, 2013). These authors suggest that the use of C₃ photosynthesis interspersed with periods of no positive carbon assimilation may be a suitable strategy, alternative to CAM, in the Southwestern African deserts.

5. Conclusions

Interest on arid-taxa and adaptations to aridity has increased with current global warming. Africa represents a model continent to explore this issue, given the ongoing aridification trend that has affected the continent for the last 20 million years. Our results from *Monsonia* support that the Namib-Karoo-Cape region, due to its climatic particularities and complex landscape, acted during the late Neogene as a cradle and (dispersal) source of new drought-tolerant lineages (e.g. subclade g), but also as a refuge for older drought-tolerant lineages, some of which migrated to the north and east, colonising semi-arid and wetter environments. It reveals also the role played by morphological innovations (life form, fruit type) and ecological opportunity (niche evolution) in the high diversity of this genus: the narrow niche breadths of species growing in coastal arid-hyperarid regions of southwestern Africa contrast with the generally broader niches and larger distributions of species occurring in other ecosystems. These patterns of adaptive evolution have been accompanied by dispersal and allopatric (neutral) speciation, conforming the large scale geographic disjunction observed today.

References

- Arakaki, M. *et al.* (2011) Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**, 8379–8384.
- Bellstedt, D. U., Galley, C., Pirie, M. D. & Linder, H. P. (2012) The migration of the palaeotropical arid flora: Zygophylloideae as an example. *Systematic Botany*. **37**, 951–959.

- Bentley, J., Verboom, G. A. & Bergh, N. G. (2014) Erosive processes after tectonic uplift stimulate vicariant and adaptive speciation: evolution in an Afrotemperate-endemic paper daisy genus. *BMC Evolutionary Biology*. **14**, 27.
- Bruyns, P. V. (2000) Phylogeny and Biogeography of the Stapeliads. *Plant Systematics and Evolution*. **221**, 199–226.
- Bruyns, P. V., Oliveira-Neto, M., Melo-de-Pinna, G. F. & Klak, C. (2014). Phylogenetic relationships in the Didiereaceae with special reference to subfamily Portulacarioideae. *Taxon*. **63**, 1053–1064.
- Burke, A. (2013) Succulent plants on arid inselbergs. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. **208**, 321–329.
- Carbutt, C. & Edwards, T. J. (2015) Reconciling ecological and phytogeographical spatial boundaries to clarify the limits of the montane and alpine regions of sub-Saharan Africa. *South African Journal of Botany*. **98**, 64–75.
- Cowling, R. M. & Hilton-Taylor, C. (1997) Phytogeography, flora and endemism. *Vegetation of southern Africa*, **1**, 43–61.
- Cowling, R. M. & Lombard, A. T. (2002) Heterogeneity, speciation/extinction history and climate: explaining regional plant diversity in the Cape Floristic Region. *Diversity and Distributions*. **8**, 163–179.
- Craig, H. (1957) Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **12**, 133–149.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. **7**, 214.
- Ellis, A. G., Weis, A. E. & Brandon, S. G. (2006) Evolutionary radiation of ‘stone plants’ in the genus *Argyroderma* (Aizoaceae): unraveling the effects of landscape, habitat, and flowering time. *Evolution*. **60**, 39–55.

- Fiz, O. *et al.* (2008) Phylogeny and historical biogeography of Geraniaceae in relation to climate changes and pollination ecology. *Systematic Botany*. **32**, 326–342.
- Galley, C., Bytebier, B., Bellstedt, D. U. & Linder, H. P. (2007) The Cape element in the Afrotropical flora: from Cape to Cairo? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **274**, 535–543.
- Goldblatt, P., Manning, J. C. & Bernhardt, P. (1995) Pollination biology of *Lapeirousia* subgenus *Lapeirousia* (Iridaceae) in southern Africa; floral divergence and adaptation for long-tongued fly pollination. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **82**, 517–534.
- Harmon, L. J., Weir, J. T., Brock, C. D., Glor, R. E. & Challenger, W. (2008) GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics*. **24**, 129–131.
- Hoetzel, S., Dupont, L. M. & Wefer, G. (2015) Miocene–Pliocene vegetation change in south-western Africa (ODP Site 1081, offshore Namibia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. **423**, 102–108.
- Jones, C. S. *et al.* (2013) Phylogenetic influences on leaf trait integration in *Pelargonium* (Geraniaceae): Convergence, divergence, and historical adaptation to a rapidly changing climate. *American Journal of Botany*. **100**, 1306–1321.
- Linder, H. P. & Hardy, C. R. (2004) Evolution of the species-rich Cape flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **359**, 1623–1632.
- Linder, H. P. (2005) Evolution of diversity: the Cape flora. *Trends in Plant Science*. **10**, 536–541.
- Linder, H. P. (2014) The evolution of African plant diversity. *Frontiers in Ecology and Evolution*. **2**, 38.

- Maddox, J. C. & Carlquist, S. (1985) Wind dispersal in Californian desert plants: experimental studies and conceptual considerations. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*. **11**, 77–96.
- Mairal, M. *et al.* (2015) Palaeo-islands as refugia and sources of genetic diversity within volcanic archipelagos: the case of the widespread endemic *Canarina canariensis* (Campanulaceae). *Molecular Ecology*. **24**, 3944–3963.
- Martínez-Cabrera, H. I., Schlichting, C. D., Silander, J. A. & Jones, C. S. (2012) Low levels of climate niche conservatism may explain clade diversity patterns in the South African genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany*. **99**, 954–960.
- Martins, E. P. & Hansen, T. F. (1997) Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. *The American Naturalist*. **149**, 646–667.
- Moffett, R. O. (1979) The genus *Sarcocaulon*. *Bothalia*. **12**, 581–613.
- Moffett, R. O. (1981) The Genus *Sarcocaulon* of Southern Africa. *National Cactus and Succulent Journal*. **36**, 65–69.
- Mooney, H. A., Troughton, J. H. & Berry, J. A. (1977) Carbon isotope ratio measurements of succulent plants in southern Africa. *Oecologia*. **30**, 295–305.
- Moore, B. R., Höhna, S., May, M. R., Rannala, B. & Huelsenbeck, J. P. (2016) Critically evaluating the theory and performance of Bayesian analysis of macroevolutionary mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 9569–9574.
- O’Leary, M. H. (1988) Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience*. **38**, 328–336.
- Olivier, J. (1995) Spatial distribution of fog in the Namib. *Journal of Arid Environments*. **29**, 129–138.
- Pagel, M., Meade, A. & Barker, D. (2004) Bayesian estimation of ancestral states on phylogenies. *Systematic Biology* **53**, 673–684.

- Pagel, M. & Meade, A. (2006) Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *The American Naturalist*. **167**, 808–825.
- Pagel, M. & Meade, A. (2014) BayesTraits Version 2.0 Computer Package. Available from: <http://www.evolution.rdg.ac.uk>
- Palazzesi, L., Gottschling, M., Barreda, V. & Weigend, M. (2012) First Miocene fossils of Vivianiaceae shed new light on phylogeny, divergence times, and historical biogeography of Geraniales. *Biological Journal of the Linnean Society*. **107**, 67–85.
- Pierce, S., Winter, K. & Griffiths, H. (2002) Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. *New Phytologist*. **156**, 75–83.
- Plana, V. (2004) Mechanisms and tempo of evolution in the African Guineo-Congolian rainforest. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. **359**, 1585–1594.
- Pokorny, L. *et al.* (2015) Living on the edge: timing of Rand Flora disjunctions congruent with ongoing aridification in Africa. *Frontiers in Genetics*. **6**, 1–15.
- Rabosky, D. L. *et al.* (2014) BAMMtools: an R package for the analysis of evolutionary dynamics on phylogenetic trees. *Methods in Ecology and Evolution*. **5**, 701–707.
- Rabosky, D. L., Mitchell, J. S. & Chang, J. (2017) Is BAMM flawed? Theoretical and practical concerns in the analysis of multi-rate diversification models. *Systematic biology*. doi: 10.1093/sysbio/syx037
- Ree, R. H. & Smith, S. A. (2008) Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology*. **57**, 4–14.
- Revell, L. J. (2012) Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*. **3**, 217–223.

- Revell, L. J. (2013) Two new graphical methods for mapping trait evolution on phylogenies. *Methods in Ecology and Evolution*. **4**, 754–759.
- Richardson, J. E. *et al.* (2001) Rapid and recent origin of species richness in the Cape flora of South Africa. *Nature*. **412**, 181–183.
- Ripley, B. S., Abraham, T., Klak, C. & Cramer, M. D. (2013) How succulent leaves of Aizoaceae avoid mesophyll conductance limitations of photosynthesis and survive drought. *Journal of Experimental Botany*. **64**, 5485–5496.
- Rödger, D. & Engler, J. O. (2011) Quantitative metrics of overlaps in Grinnellian niches: advances and possible drawbacks. *Global Ecology and Biogeography*. **20**, 915–927.
- Rundel, P. W., Esler, K. J. & Cowling, R. M. (1999) Ecological and phylogenetic patterns of carbon isotope discrimination in the winter-rainfall flora of the Richtersveld, South Africa. *Plant Ecology*. **142**, 133–148.
- Sanmartín, I., Anderson, C. L., Alarcón, M., Ronquist, F. & Aldasoro, J. J. (2010) Bayesian island biogeography in a continental setting: the Rand Flora case. *Biology Letters*. **6**, 703–707.
- Schnitzler, J. *et al.* (2011) Causes of plant diversification in the Cape biodiversity hotspot of South Africa. *Systematic Biology*. **60**, 343–357.
- Schoener, T. W. (1968) The *Anolis* lizards of Bimini: resource partitioning in a complex fauna. *Ecology*. **49**, 704–726.
- Senut, B., Pickford, M. & Ségalen, L. (2009) Neogene desertification of Africa. *Comptes Rendus Geoscience*. **341**, 591–602.
- Sepulchre, P. *et al.* (2006) Tectonic uplift and Eastern Africa aridification. *Science*. **313**, 1419–1423.
- Siesser, W. G. (1980) Late Miocene origin of the Benguela upswelling system off northern Namibia. *Science*. **208**, 283–285.

- Smith, B. N. & Epstein, S. (1971) Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiology*. **47**, 380–384.
- Sytsma, K. J., Spalink, D. & Berger, B. (2014) Calibrated chronograms, fossils, outgroup relationships, and root priors: re-examining the historical biogeography of Geraniales. *Biological Journal of the Linnean Society*. **113**, 29–49.
- Touloumenidou, T., Bakker, F. T. & Albers, F. (2007) The phylogeny of *Monsonia* L. (Geraniaceae). *Plant Systematics and Evolution*. **264**, 1–14.
- Valente, L. M. & Vargas, P. (2013) Contrasting evolutionary hypotheses between two mediterranean-climate floristic hotspots: the Cape of southern Africa and the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*. **40**, 2032–2046.
- Van Rooyen, M. W., Theron, G. K. & Grobbelaar, N. (1990) Life form and dispersal spectra of the flora of Namaqualand, South Africa. *Journal of Arid Environments*. **19**, 133–145.
- Venter, H. J. T. (1979) *A monograph of Monsonia L. (Geraniaceae)*. Wageningen: Mededlingen Landbouwhoogeschool.
- Verboom, G. A. *et al.* (2009) Origin and diversification of the Greater Cape flora: ancient species repository, hot-bed of recent radiation, or both? *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **51**, 44–53.
- Von Caemmerer, S. (1992) Carbon isotope discrimination in C_3 - C_4 intermediates. *Plant, Cell and Environment*. **15**, 1063–1072.
- Warren, D. L., Glor, R. E. & Turelli, M. (2008) Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*. **62**, 2868–2883.
- Warren, D. L., Glor, R. E. & Turelli, M. (2010) ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*. **33**, 607–611.

- Winter, B. D. (1971) Floristic relationships between northern and southern arid areas in Africa. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*. **10**, 424–437.
- Winterbottom, J. M. (1967) Climatological implications of avifaunal resemblances between South Western Africa and Somaliland. *Palaeoecology of Africa*. **2**, 77–79.
- Young, A. J. & Desmet, P. G. (2016) The distribution of the dwarf succulent genus *Conophytum* NE Br. (Aizoaceae) in southern Africa. *Bothalia-African Biodiversity and Conservation*. **46**, 1–13.
- Zachos, J. C., Dickens, G. R. & Zeebe, R. E. (2008) An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. *Nature*, **451**, 279–283.

Supplementary Information

Table S1. Localities of the sampled populations of *Monsonia* and GenBank accession numbers. Numbers in bold indicate the new sequences. * indicate chloroplast complete-genome sequenced.

Species	Locality and collector number	<i>trnL-F</i>	<i>trnS-G</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	ITS
<i>California macrophylla</i>	---	DQ072015	---	---	---	EF185338
	---	---	JQ031013*	---	---	---
	---	---	---	KJ916367	KJ916488	---
<i>Erodium chrysanthum</i>	---	KJ701602*	KJ701602*	KJ701602*	KJ701602*	---
	---	---	---	---	---	EF185361
<i>Erodium glandulosum</i>	Spain, Barcelona, Montcau ; Sáez 5001	HQ677619	KX661374	KY630145	KX661375	EF185367
<i>Erodium foetidum</i>	---	KF771022*	KF771022*	KF771022*	KF771022*	---
	Spain, Girona, Cap Norfeu; Aedo CA4920	---	---	-----	---	HQ677604
<i>Geranium macrorrhizum</i>	---	---	---	EU922243	EU922281	---
	France, Pyrenees; Aldasoro s.n.	KX661378	KY630153	---	---	DQ525073
<i>Geranium nepalense</i>	---	---	--	JF953873	JF941756	DQ192637
	Japan, Honshu; Estebanez, s.n.	KX661376	---	---	---	---
<i>Geranium nodosum</i>	---	---	--	KP963400	JX913480	---
	Italy, Abruzzo, Ceppo	DQ452922	---	---	---	KX661379
<i>Geranium platypetalum</i>	Turkey, Rize, Ovit Dağı Geçidi - Nisa 891 (MA)	KX661377	---	---	---	AJ884938
	---	---	--	KP963402	KP963382	---
<i>Hypseocharis bilobata</i>	---	KF240616*	KF240616*	KF240616*	KF240616*	---
	---	---	---	---	---	HE795067
<i>Hypseocharis pimpinellifolia</i>	---	HE795472	--	--	---	HE795068
	---	---	---	---	DQ317048	---
<i>Monsonia angustifolia</i>	Ethiopia, Moyale to Mega; Aldasoro 10238 (MA)	DQ452891	KX470525	KX470466	KX470490	---
	---	---	---	---	---	AF505632
<i>Monsonia attenuata</i>	South Africa, Cathedral Peak; Carbutt 271 (MSUN)	---	KY630154	KY630146	KX470491	---
	---	AY036161	---	--	---	AF505630
<i>Monsonia brevirostrata</i>	South Africa, Lesobeng; Germishuizen 1238 (MO)	---	KX470526	KX470467	KX470492	---
	---	AY036159	---	---	---	AF505631

<i>Monsonia burkeana</i>	Waterberg, Ratelhoek; Germishuizen 957 (PRET)	KY576063	KX470527	KX470468	KX470493	KX470455
<i>Monsonia camdeboense</i>	South Africa, cultivated in Kirstenbosch	DQ452900	KX470528	KX470469	KX470494	KX470456
<i>Monsonia ciliata</i>	South Africa, Steinkopf, Anenous Pass; Aldasoro	---	KX470529	KX470470	KX470495	KX470457
	---	AY036166	---	---	---	---
<i>Monsonia crassicaule</i>	South Africa, 33 km Steinkopf; Aldasoro 2416	---	KX470530	KX470471	KX470496	---
	---	AY036165	---	---	---	AF505637
<i>Monsonia deserticola</i>	Namibia, Aus; Lavranos & Pehlemann 19636 (MO)	---	KY630155	KX470472	KX470497	---
	---	AY036178	---	---	---	AF505652
<i>Monsonia drudeana</i>	Namibia, Gariiep 13 km from the station; Aldasoro	KX470521	KX470531	KX470473	KX470498	KX470458
<i>Monsonia emarginata</i>	---	---	---	---	---	HE795069
	South Africa, East London; Phyllipson 379 (UPS)	DQ452893	KX470532	KX470474	KX470499	---
<i>Monsonia flavescens</i>	South Africa, Oranjemund; Aldasoro 9099 (MA)	---	KX470533	KX470475	KX470500	---
	---	AY036164	---	---	---	AF505636
<i>Monsonia glauca</i>	---	AF505643	---	---	---	AF551333
	South Africa, Upington Karoides; UM581 (MSUN)	---	KY630157	KX470476	KX470493	---
<i>Monsonia grandifolia</i>	---	AY036158	---	---	---	AF505629
	South Africa, 10km NE Ixopo Highland Sourveld	---	KX470534	KX470477	KX470502	---
<i>Monsonia heliotropioides</i>	---	AY036177	---	---	---	AF505651
	Algeria, Hoggar, Assekrem Mt. 1700 m; Aldasoro	---	KX470535	KX470478	KX470503	---
<i>Monsonia herrei</i>	South Africa, Steinkopf-Vioolsdrift; Aldasoro 9042	KX470522	KX470536	KX470479	KX470504	KX470459
<i>Monsonia ignorata</i>	Namibia, Windhoek, Sossusvlei; Vargas 421PV02	DQ072010	KY630156	KX470480	KX470505	---
	---	---	---	---	---	AF505647
<i>Monsonia inermis</i>	Namibia, 3km SW Rosh Pinah (MSUN)	---	KY630158	KY630147	KX470506	---
	---	AY036162	---	---	---	AF505634
<i>Monsonia lheritieri</i>	South Africa, Garies-Bitterfontein; Krad A9078	KX470523	KX470537	KY630148	KX470507	KX470460
<i>Monsonia longipes</i>	Ethiopia, Negele 37 km to Moyale;	KX470524	KX470538	KX470481	KX470508	KX470461
<i>Monsonia luederitziana</i>	---	AY036173	---	---	---	AF505646
	South Africa, 18 Km Fish River Canyon; Aldasoro	---	KX470539	KX470482	KX470509	---
<i>Monsonia marlothii</i>	---	---	---	KT692739*	---	---
	Namibia, Swakopmund, Khan canyon; Vargas	DQ452899	KX470540	---	DQ452867	KX470462
<i>Monsonia mossamedensis</i>	---	AY036169	---	---	---	AF505641

	Angola, S. Orumpembe, Skeleton Coast; 3603	---	KY630159	KY630149	KX470510	---
<i>Monsonia multifida</i>	---	---	---	---	---	AF505635
	South Africa, Kirstenbosch; Gassner 77 (MA)	DQ452898	KX470541	KX470483	KX470511	---
<i>Monsonia natalensis</i>	South Africa, Port Edward; Umtauna 280CC	---	KX470542	KX470484	KX470512	---
	---	AY036156	---	---	---	AF505626
<i>Monsonia nivea</i>	Morocco, Col du Mekmek; Aldasoro 188865	DQ452895	KX470543	KX470485	KX470513	---
	---	---	---	---	---	AF505649
<i>Monsonia parvifolia</i>	---	---	---	---	---	AF505644
	South Africa, Vioolsdrift; Fairall s.n. (MO)	DQ452894	KX470544	KX470486	KX470514	---
<i>Monsonia patersonii</i>	Namibia, Aus-Witput; Aldasoro 9054 (MA)	---	KX470545	KX470487	KX470515	KX470463
	---	AY036168	---	---	---	---
<i>Monsonia praemorsa</i>	South Africa, Natal, Clermont; Wood s.n. (G)	DQ452892	KX470546	KY630150	KX470516	KX470464
<i>Monsonia salmoniflora</i>	Namibia, Aus-Witput 46 km of Aus; Aldasoro 9049	---	KX470547	KY630151	KX470517	---
	---	AY036167	---	---	---	AF505639
<i>Monsonia senegalensis</i>	Ethiopia, Negele to Moyale; Aldasoro 10299	---	KX470548	KY630152	KX470518	---
	---	AY036179	---	---	---	AF505633
<i>Monsonia speciosa</i>	South Africa, Tulbagh Cape Colony	DQ452896	KX470549	EU922387	KX470519	---
	---	---	---	---	---	AF505648
<i>Monsonia umbellata</i>	Namibia, cult. in Kirstenbosch; van Jaarsveld 8699	---	KY630160	KX470489	KX470520	---
	---	AY036172	---	---	---	AF505645
<i>Monsonia vanderietiae</i>	South Africa, Fish River; Aldasoro 9088	---	KX470550	---	---	KX470465
	---	---	---	EU922459	---	---
	---	AF167150	---	---	AF167150	---
<i>Pelagonium abrotanifolium</i>	---	---	---	JQ479110	JQ479167	---
	---	---	---	---	---	AF256592
<i>Pelagonium exstipulatum</i>	---	---	---	JQ479087	JQ479144	---
	South Africa, Little Karoo; Bakker STEU1656	Z95284	KY630161	---	---	Z95263

Table S2. Morphological and habitat features for *Monsonia* species studied here

Subclade	Species	Roots	Habit	Fruits	Habitat
a	<i>M. glauca</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Barbate	Grasslands, steppes and savannas, 300-1800m
	<i>M. longipes</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Barbate	Grasslands, steppes and savannas, 600-3400m
b	<i>M. drudeana</i>	Rhizome	Perennial	Plumose	Sands, riversides, 0-1000m
	<i>M. luederitziana</i>	Herbaceous	Perennial	Plumose	Sands, pebble flats and riversides, 200-1400m
	<i>M. parvifolia</i>	Rhizome	Perennial	Plumose	Sands, stony soils, pebble flats and riverbeds, 100-1500m
	<i>M. umbellata</i>	Rhizome	Perennial	Plumose	Sands, stony soils, and riverbeds, 0-1800m
c	<i>M. heliotropioides</i>	Rhizome	Perennial	Plumose	Sands, stony soils, cultivate places and riverbeds, 0-2200m
	<i>M. nivea</i>	Rhizome, often with tubers	Perennial	Plumose	Sands, stony soils, and riverbeds, 0-2400m
d	<i>M. deserticola</i>	Rhizome	Perennial	Plumose	Sands, gravelly, pebble flats, 0-1500m
	<i>M. ignorata</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Plumose	Sands, 0-1400m
e	<i>M. speciosa</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Barbate	Grasslands on sandy soils, 0-500m
f	<i>M. senegalensis</i>	Herbaceous root	Annual	Barbate	Disturbed sites, grasslands, steppes and savannas, 0-2600m
	<i>M. attenuata</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Barbate	Grasslands and eroded sites among rocks, 1300-2400m
	<i>M. burkeana</i>	Rhizome	Perennial	Barbate	Disturbed sites, grasslands, and savannas, 800-2000m
	<i>M. brevirostrata</i>	Herbaceous root	Annual	Barbate	Grasslands and eroded sites among rocks, 1500-2800m
	<i>M. angustifolia</i>	Herbaceous root	Annual	Barbate	Disturbed sites, grasslands, steppes, and savannas 0-2200m
	<i>M. grandifolia</i>	Rhizome	Perennial	Barbate	Grasslands and eroded sites among rocks, 300-1600m
	<i>M. transvaalensis</i>	Rhizome	Perennial	Barbate	Grasslands, 1000-2300m
	<i>M. emarginata</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Barbate	Grasslands, steppes and savannas, 0-1100m
	<i>M. natalensis</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Barbate	Grasslands, 0-600m
<i>M. praemorsa</i>	Rhizome with tubers	Perennial	Barbate	Grasslands, 0-700m	
g	<i>M. crassicaule</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Stony soils and pebble flats, outcrops of quartzite, 0-1700 m

<i>M. flavescens</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 0-1200 m
<i>M. ciliata</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 100-600 m
<i>M. multifida</i>	Shallow roots, swollen	Perennial	Plumose	Stony soils and rocky flats, 0-600 m
<i>M. herrei</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Mountain sides, stony soils, outcrops of quartzite, 200-1000
<i>M. inermis</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 0-1300 m
<i>M. marlothii</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 0-1500 m
<i>M. mossamedensis</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 0-800 m
<i>M. patersonii</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 0-1700 m
<i>M. camdeboense</i>	Shallow roots, swollen	Perennial	Plumose	Mountain sides, rocky hills, 100-1600m
<i>M. lheritieri</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 0-1200 m
<i>M. vanderietiae</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Mountain sides, rocky hills, outcrops of quartzite, 0-700 m
<i>M. salmoniflora</i>	Shallow roots, not swollen	Perennial	Plumose	Sandy or rocky flats, 0-1600 m

Table S3. Specific primer pairs and conditions of the polymerase chain reaction for the amplification of DNA markers used in *Monsonia*.

Marker	Primer Sequence	Author primer's	Pre-treatment	Treatment	Final stage
<i>trnL^{UAA}-F</i>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991	1min at 96°C	30 cycles of 1min at 96°C, 1min at 50°C, 2min at 72°C	10min at 72°C
<i>trnF^{GAA}-R</i>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG				
<i>trnS^{GCU}-F</i>	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	Hamilton, 1999	1min at 96°C	30-40 cycles of 45 s at 96°C, 1min 30s -2min at 45°C-54°C, 1min 30s - 2min at 72°C	10min at 72°C
<i>trnG^{UCC}-R</i>	GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C				
<i>rbcL¹-F</i>	ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC	Olmstead <i>et al.</i> , 1992	1min at 95°C	30 cycles of 45 s- 1min at 95°C, 30s - 1min at 48-50°C, 2min at 72°C	10min at 72°C
<i>rbcL⁷²⁴-R</i>	TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC				
<i>matK⁵-F</i>	GTA TCG CAC TAT GTA TCA TTT GA	Johnson & Soltis, 1995	3min at 95°C	35 cycles of 30s at 95°C, 4s at 47°C, 1min 30s at 72°C	10min at 72°C
<i>matK^{2M}-R</i>	CAC ACG GCT TTC CCT ATG TAT AC				
<i>ITS^{1A}-F</i>	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> , 1990	5min at 95°C	38 cycles of 30 s at 95°C, 30s at 52°C, 1min at 72° C	10min at 72°C
<i>ITS⁴-R</i>	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC				

Table S4. Weighting of each climatic variable in the PCA of all species. Values indicate the relative contributions of climatic variables to axis 1, 2 and 3.

Variable	Component 1	Component 2	Component 3
Variance	41.1%	28.0%	15.4%
Altitude	0,2009214	-0,30858327	-0,54585253
Bio1- Annual Mean Temperature	-0,4801170	-0,1982986	0,13454763
Bio5 - Max Temperature of Warmest Month	-0,4536112	-0,11966219	-0,23049589
Bio6 - Min Temperature of Coldest Month	-0,2592365	-0,09712167	0,62154019
Bio8 - Mean Temperature of Wettest Quarter	-0,3303685	-0,31192271	-0,23871221
Bio 10 - Mean Temperature of Warmest Quarter	-0,4855650	-0,11567694	-0,0996655
Bio12 - Annual precipitation	0,1743723	-0,55833744	0,16496203
Bio 17 - Precipitation of Driest Quarter	0,2218058	-0,35000629	0,38348203
Bio18 - Precipitation of Warmest Quarter	0,1778517	-0,54477547	-0,05756475

Table S5. Weighting of each climatic variable in the PCA of South African species. Values indicate the relative contributions of climatic variables to axis 1, 2 and 3.

Variable	Component 1	Component 2	Component 3
Variance	33.5%	30.3%	16.6%
Altitude	-0,04141628	0,52449145	-0,092067326
Rham - Relative humidity during the daytime	0,34799230	-0,46176563	-0,188393798
Bio 3 - Isothermality	-0,02349262	-0,14278512	-0,648446682
Bio 5 - Max Temperature of Warmest Month	-0,22193288	0,27008238	0,372748411
Bio 18 - Precipitation of Warmest Quarter	0,42687053	0,36630343	-0,159216769
Bio 20 - Annual Mean Radiation	-0,54478218	0,06217355	-0,003911671
Bio 22 - Lowest Weekly Radiation	-0,26268875	0,28987012	-0,594671287
Bio 29 - Weekly Moisture Index	0,46888756	0,20710226	0,116204672

Table S6. Mericarp features in *Monsonia*.

	Lofting speed mean in m/s (s.d.)	Mericarp length (body plus awn) in mm (s.d.)	Mericarp body length in mm (s.d.)	Mericarp weight in mg. (s.d.)	Mericarp type: plumose (p) or barbate (b)
<i>M. glauca</i>	3.325 (0.05)	57.0 (7.1)	13.5 (2.1)	20 (3.2)	b
<i>M. longipes</i>	5.0 (0.24)	63.1 (7.4)	11.5 (3.2)	14.1 (1.9)	b
<i>M. drudeana</i>	1.41 (0.2)	19 (1.2)	5.9 (1.2)	9.2 (1.2)	p
<i>M. parvifolia</i>	1.475 (0.1)	58 (6.2)	6.2 (1.4)	4.3 (1.1)	p
<i>M. luederitziana</i>	2.075 (0.17)	60 (7.0)	5.6 (1.2)	12.1 (3.2)	p
<i>M. umbellata</i>	1.275 (0.1)	61 (6.3)	5.3 (0.87)	4.6 (1.0)	p
<i>M. heliotropioides</i>	0.862 (0.05)	38 (2.2)	5.2 (1.23)	2.8 (0.8)	p
<i>M. nivea</i>	0.838 (0.05)	61 (6.2)	5.1 (1.40)	2.5 (0.0)	p
<i>M. ignorata</i>	1.30 (0.08)	17 (1.0)	5.2 (0.81)	10.4 (2.0)	p
<i>M. deserticola</i>	1.57(0.05)	37 (4.1)	4.9 (1.1)	2.0 (0.6)	p
<i>M. attenuata</i>	3.51 (0.19)	48.0 (4.2)	9.6 (2.5)	11.8 (3.0)	b
<i>M. brevirostrata</i>	2.77 (0.18)	16.4 (1.9)	5.9 (1.9)	2.4 (0.6)	b
<i>M. natalensis</i>	3.75 (0.20)	57.0 (2.5)	17.0 (3.2)	19.5 (4.1)	b
<i>M. transvaalensis</i>	3.80 (0.21)	6.10 (1.1)	15.2 (3.0)	17.5 (3.4)	b
<i>M. angustifolia</i>	3.10 (0.18)	48.3 (5.3)	7.6 (1.2)	3.8 (0.9)	b
<i>M. senegalensis</i>	3.625 (0.15)	45.0 (3.3)	7.2 (0.9)	8.0 (1.2)	b
<i>M. burkeana</i>	3.089 (0.13)	63.0 (5.2)	12.3 (4.2)	7.3 (0.9)	b
<i>M. grandifolia</i>	3.10 (0.12)	63.8 (5.9)	12.5 (3.2)	7.0 (1.0)	b
<i>M. lanuginosa</i>	3.99 (0.21)	58.9 (4.1)	12.5 (1.3)	11.0 (1.2)	b
<i>M. emarginata</i>	2.875 (0.17)	50.0 (4.2)	13.5 (2.1)	12.2 (1.5)	b
<i>M. praemorsa</i>	4.10 (0.08)	48.0 (3.2)	14.0 (2.0)	18.5 (1.4)	b
<i>M. speciosa</i>	4.475 (0.1)	66.0 (4.6)	13.5 (1.4)	20.0 (4.6)	b
<i>M. lheritieri</i>	2.15 (0.13)	65.0 (3.8)	14.0 (2.2)	25.4 (4.0)	p
<i>M. patersonii</i>	2.05 (0.06)	56.0 (4.2)	5.3 (1.1)	4.0 (0.7)	p
<i>M. salmoniflora</i>	1.675 (0.1)	39.6 (3.2)	8.9 (1.2)	5.1 (0.8)	p
<i>M. camdeboense</i>	2.075 (0.1)	48.0 (3.9)	6.8 (1.2)	2.8 (1.0)	p
<i>M. mossamedensis</i>	2.50 (0.06)	42.8 (4.0)	7.0 (1.6)	3.1 (0.6)	p
<i>M. crassicaule</i>	2.825 (0.1)	59.0 (6.2)	13.0 (3.3)	6.8 (1.7)	p
<i>M. marlothii</i>	1.60 (0.1)	43.0 (5.2)	8.2 (1.3)	4.0 (0.4)	p
<i>M. multifida</i>	2.30 (0.08)	40.0 (3.8)	11.0 (2.3)	7.0 (1.2)	p
<i>M. inermis</i>	1.42 (0.11)	38.2 (3.2)	6.0 (1.4)	4.9 (1.0)	p
<i>M. ciliata</i>	1.67(0.12)	43.1 (5.0)	9.0 (1.2)	4.7 (0.8)	p
<i>M. herrei</i>	2.112 (0.21)	48.0 (4.2)	10.4 (2.3)	5.4 (0.7)	p
<i>M. vanderietiae</i>	1.175 (0.11)	58.0 (6.1)	11.4 (2.2)	6.4 (1.1)	p
<i>M. flavescens</i>	1.904 (0.15)	54.4 (5.2)	9.2 (2.0)	4.0 (0.9)	p

Table S7. Pairwise similarity in the ecological niche using the indexes D and I in selected sister and non-sister species and time distances among them (**divergent with a 99% signification).

Clade	Species pair	I	D	Time distances (Ma)
g	<i>M. herrei</i> – <i>M. multifida</i>	0.790**	0.498**	0.64
	<i>M. camdeboense</i> – <i>M. patersoni</i>	0.264**	0.112**	1.16
	<i>M. crassicaule</i> – <i>M. flavescens</i>	0.628**	0.318**	1.54
	<i>M. salmoniflora</i> – <i>M. vanderietiae</i>	0.378**	0.149**	1.56
	<i>M. ciliata</i> – <i>M. crassicaule</i>	0.497**	0.260**	1.95
	<i>M. ciliata</i> – <i>M. flavescens</i>	0.751	0.526	2.10
	<i>M. herrei</i> – <i>M. inermis</i>	0.846	0.637	2.84
	<i>M. ciliata</i> – <i>M. herrei</i>	0.963	0.792	3.96
	<i>M. flavescens</i> – <i>M. inermis</i>	0.949	0.769	4.08
	<i>M. flavescens</i> – <i>M. multifida</i>	0.913	0.697	4.06
f	<i>M. natalensis</i> – <i>M. transvaalensis</i>	0.169**	0.071**	0.20
	<i>M. emarginata</i> – <i>M. praemorsa</i>	0.604**	0.349**	0.38
	<i>M. grandifolia</i> – <i>M. praemorsa</i>	0.810**	0.521**	1.56
	<i>M. attenuata</i> – <i>M. brevisrostrata</i>	0.900	0.658	6.89
b	<i>M. luederitziana</i> – <i>M. umbellata</i>	0.845**	0.571**	3.32
	<i>M. luederitziana</i> – <i>M. parvifolia</i>	0.974	0.832	6.60
d	<i>M. deserticola</i> – <i>M. ignorata</i>	0.603**	0.321**	24.3
g-d	<i>M. deserticola</i> – <i>M. vanderietiae</i>	0.052**	0.009**	36.6
	<i>M. deserticola</i> – <i>M. patersonii</i>	0.844	0.583	36.6
g-b	<i>M. flavescens</i> – <i>M. drudeana</i>	0.940	0.723	43.6
	<i>M. salmoniflora</i> – <i>M. parvifolia</i>	0.852	0.608	43.6
	<i>M. salmoniflora</i> – <i>M. luederitziana</i>	0.903	0.684	43.6
	<i>M. marlothii</i> – <i>M. umbellata</i>	0.880	0.664	43.6
	<i>M. inermis</i> – <i>M. drudeana</i>	0.890	0.629	43.6
	<i>M. patersonii</i> – <i>M. drudeana</i>	0.905	0.667	43.6
d-b	<i>M. drudeana</i> – <i>M. deserticola</i>	0.885	0.708	43.6

Table S8. Niche analyses in *Monsonia*: number of localities, niche breadth, with uncertainty (UC), and mean annual precipitation for each species. The aridity index (AI) was used to classify the habitats between two major types: hyperarid or arid (a; AI < 0.2) and semiarid and relatively wet (s; AI > 0.2).

	Species and subclade	Nº of localities	Niche breadth	UC	Mean annual precipitation (mm) (sd)	Aridity index (sd)	Habitats a / s	
a	<i>M. glauca</i>	56	0.2750	0.9361	451 (229)	0.276	s	
	<i>M. longipes</i>	20	0.1875	0.9322	827 (343)	0.545	s	
b	<i>M. drudeana</i>	10	0.0238	0.7974	48 (26)	0.040	a	
	<i>M. luederitziana</i>	17	0.2098	0.9095	154 (57)	0.090	a	
	<i>M. parvifolia</i>	20	0.0898	0.8672	124 (41)	0.071	a	
	<i>M. umbellata</i>	40	0.2981	0.9389	210 (113)	0.121	a	
c	<i>M. heliotropioides</i>	26	0.4933	0.9736	128 (122)	0.083	a	
	<i>M. nivea</i>	23	0.6907	0.9850	60 (48)	0.034	a	
d	<i>M. deserticola</i>	12	0.0299	0.8143	80 (42)	0.065	a	
	<i>M. ignorata</i>	13	0.0625	0.8598	45 (26)	0.030	a	
e	<i>M. speciosa</i>	19	0.0716	0.8757	616 (283)	0.474	s	
	<i>M. senegalensis</i>	103	0.4529	0.9681	441 (289)	0.243	s	
	<i>M. attenuata</i>	21	0.1277	0.9259	849 (179)	0.624	s	
	<i>M. burkeana</i>	36	0.4436	0.9643	583 (177)	0.370	s	
	<i>M. brevirostrata</i>	13	0.1887	0.9259	826 (183)	0.639	s	
	f	<i>M. angustifolia</i>	157	0.3545	0.9547	687 (325)	0.426	s
		<i>M. grandifolia</i>	13	0.2184	0.9281	870 (127)	0.654	s
		<i>M. transvaalensis</i>	10	0.1696	0.9206	1060 (146)	0.835	s
		<i>M. emarginata</i>	22	0.0933	0.8830	639 (243)	0.554	s
		<i>M. natalensis</i>	6	0.0056	0.7029	1135 (10)	0.989	s
		<i>M. praemorsa</i>	39	0.1975	0.9339	910 (151)	0.675	s
	g	<i>M. crassicaule</i>	115	0.1740	0.9106	214 (172)	0.151	a
<i>M. flavescens</i>		30	0.0625	0.7144	61 (18)	0.046	a	
<i>M. ciliata</i>		14	0.0953	0.8779	109 (29)	0.081	a	
<i>M. multifida</i>		19	0.0086	0.7331	51 (9)	0.039	a	
<i>M. herrei</i>		9	0.1286	0.8999	114 (40)	0.079	a	
<i>M. inermis</i>		15	0.0149	0.7538	64 (19)	0.047	a	
g		<i>M. marlothii</i>	33	0.1406	0.9037	149 (113)	0.088	a
		<i>M. mossamedensis</i>	9	0.0226	0.7753	33 (22)	0.021	a
		<i>M. patersonii</i>	80	0.0346	0.8244	61 (42)	0.229	a
		<i>M. camdeboense</i>	32	0.0709	0.8583	337 (57)	0.229	a
		<i>M. lheritieri</i>	47	0.0209	0.7926	172 (45)	0.118	a
		<i>M. vanderietiae</i>	15	0.0490	0.8334	416 (64)	0.391	s
		<i>M. salmoniflora</i>	86	0.2725	0.9347	163 (105)	0.108	a
		Total	1118					

Table S9. Results from model averaging and variable selection procedure with PGLS models. The values given in the table are the estimated coefficients of continuous variables (niche breadth, aridity index), and discrete variables (fruit type and life form), and corresponding p-values, correlation (R), AIC and as parameter estimate: alpha(a) or lambda (l) values. The abbreviations in the correlation mean: S = succulent, A = annual, P = perennial.

Variables	Coefficient	p-value	Correlation (R)	AIC	alpha (a) or lambda (l)
Niche breadth - Aridity	-0.3397384	0.0130	-0.448	-22.4397	a = 0.1871581
Niche breadth - Life form	-0.2477728	0.0133	-0.901 (S and A)	-27.0928	a = 7.778259
	-0.1228906	0.1917	-0.923 (P and A)		
Niche breadth - Fruit type	-0.08161032	0.1745	-0.799 (Plumose fruit)	-22.1711	a = 4.184644
Aridity - Life Form	-0.2788184	0.0779	-0.401 (S and A)	-14.3505	l = 0.7816879
	0.07252323	0.5069	-0.682 (P and A)		
Aridity - Fruit type	-0.4395560	0	-0.801 (Plumose fruit)	-31.5374	a = 2.640614

Table S10. Carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$) measured in *Monsonia*. Values of -22‰ to -33‰ are typical of C_3 species and values between -9‰ to -18‰ are typical of C_4 species and obligate CAM species (Farquhar *et al.*, 1989; Pierce *et al.*, 2002).

Species	Locality and collector number or reference	Average calibrated N=3	Stdev (batches)
<i>Monsonia angustifolia</i>	South Africa, N Transvaal; Penther 2218 (W)	-30.27	0.14
<i>M. attenuata</i>	South Africa, Cathedral Peak; Carbutt 271 (MSUN)	-27.53	0.07
<i>M. brevisrostrata</i>	Lesotho, Qacha's Nek; Albers 4015b (MSUN)	-28.82	0.05
<i>M. crassicaule</i>	Rundel <i>et al.</i> ,1999	-18.3*	*
<i>M. deserticola</i>	Namibia, Aus-Namib; Rand 100123 (MSUN)	-26.09	0.1
<i>M. emarginata</i>	South Africa, Stutterheim, Pine Forest; Carbutt 312 (MSUN)	-31.78	0.06
<i>M. grandiflora</i>	South Africa, 10km NE Ixopo Highland Sourveld (MSUN)	-29.62	0.02
<i>M. heliotropioides</i>	Algeria, Oudja; Molero BC-804188	-29.17	0.13
<i>M. ignorata</i>	Namibia, Windhoek, Sossusvlei; Vargas 421PV02 (MA)	-26.84	0.04
<i>M. inermis</i>	Namibia, 3km SW Rosh Pinah (MSUN)	-28.59	0.03
<i>M. lheritieri</i>	South Africa, Garies-Bitterfontein; Doring Krad A9078	-24.2	0.01
<i>M. luederitziana</i>	South Africa, 18 Km Fish River, Grünau; Klein, A9074	-25.87	0.01
<i>M. marlothii</i>	Namibia, Swakopmund, Khan canyon; Vargas 423PV03 (MA)	-27.94	0.05
<i>M. mossamedensis</i>	Mooney <i>et al.</i> ,1983	-24.5, -26.1	-
<i>M. natalensis</i>	South Africa, Port Edward; Umtauna 280CC	-30.21	0.03
<i>M. nivea</i>	Morocco, High Atlas, S of the M'Goun Mt.; Staudinger s.n.	-33.45	0.02
<i>M. parvifolia</i>	Namibia, Gariiep, Great Buschmansland; Schlechter s.n. (W)	-22.12	0.03
<i>M. patersonii</i>	Namibia, Aus-Witput A9054 (MA)	-27.85	0.06
<i>M. salmoniflora</i>	Namibia, Aus-Witput 40km from Aus, 9049	-25.85	0.05
<i>M. senegalensis</i>	Ethiopia, Negele to Moyale, A10299	-28.56	0.08
<i>M. speciosa</i>	South Africa	-30.00	0.07
<i>M. umbellata</i>	Namibia, cult. in Kirstenbosch; van Jaarsveld 8699	-25.77	0.02

* Estimated in another study with a different method, here these values indicate C_3 photosynthesis (compare Rundel *et al.*, 1999).

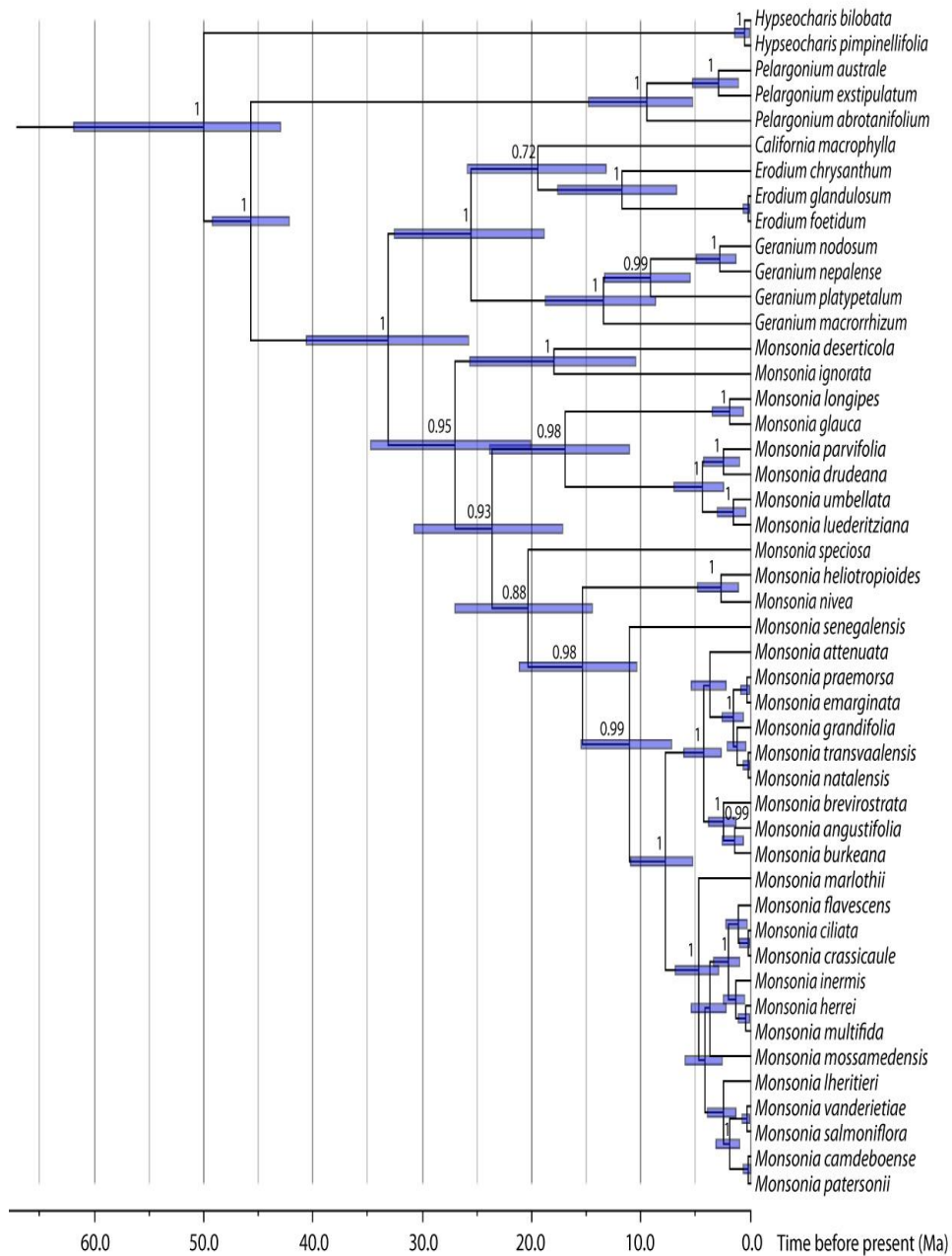


Figure S1. Phylogenetic tree of *Monsonia* using the ITS dataset.

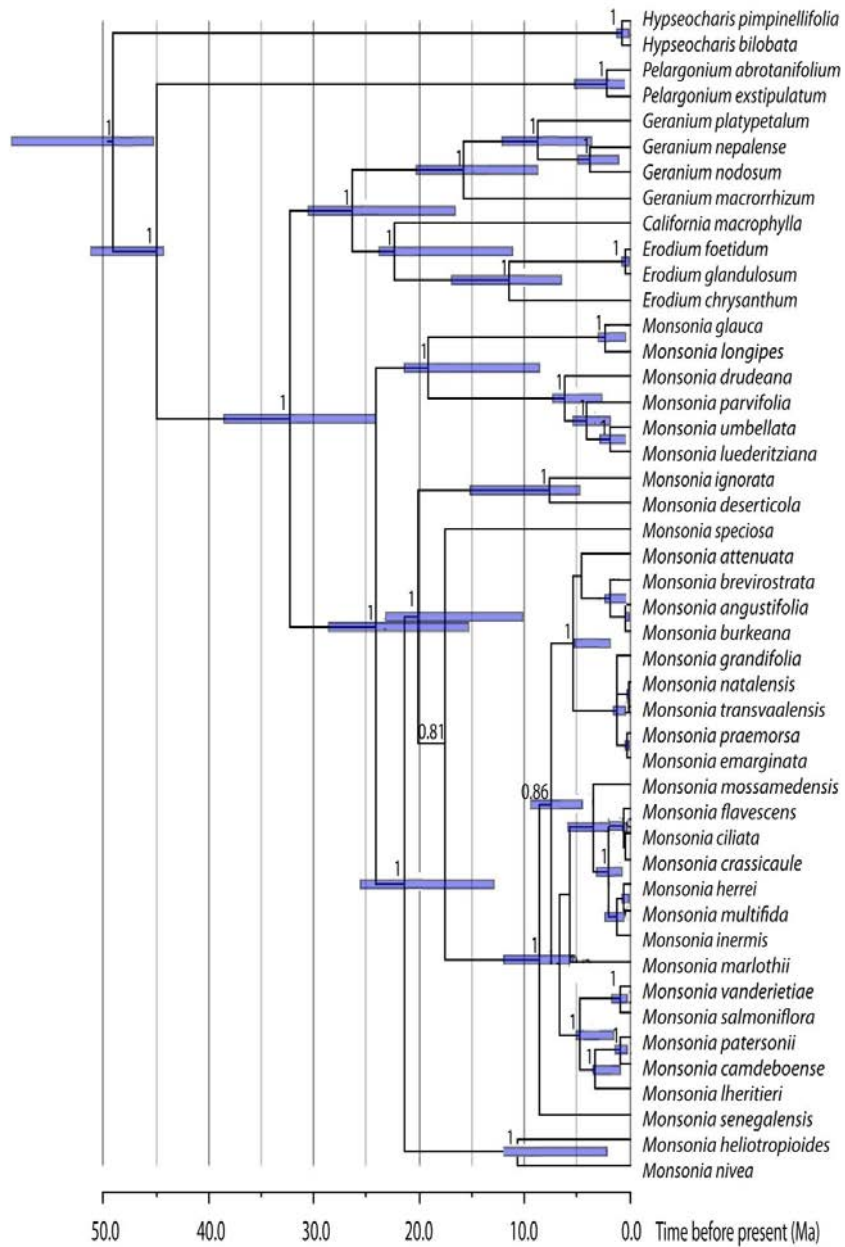


Figure S2. Phylogenetic tree of *Monsonia* using the plastid dataset.

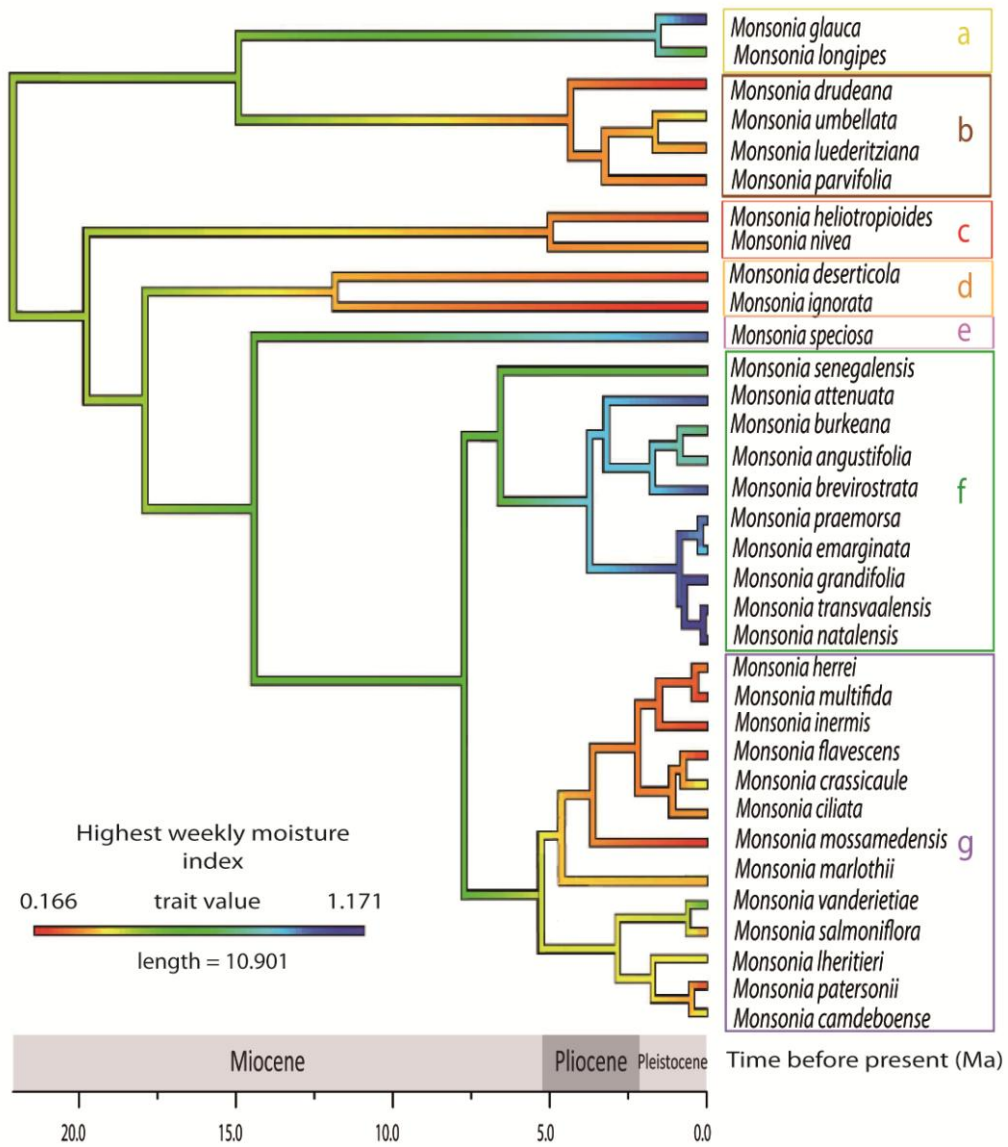


Figure S3. MCC tree of *Monsonia* with shifts in highest weekly moisture inferred using the R package *phytools* (Revell, 2012) with the Ornstein–Uhlenbeck continuous evolutionary model.

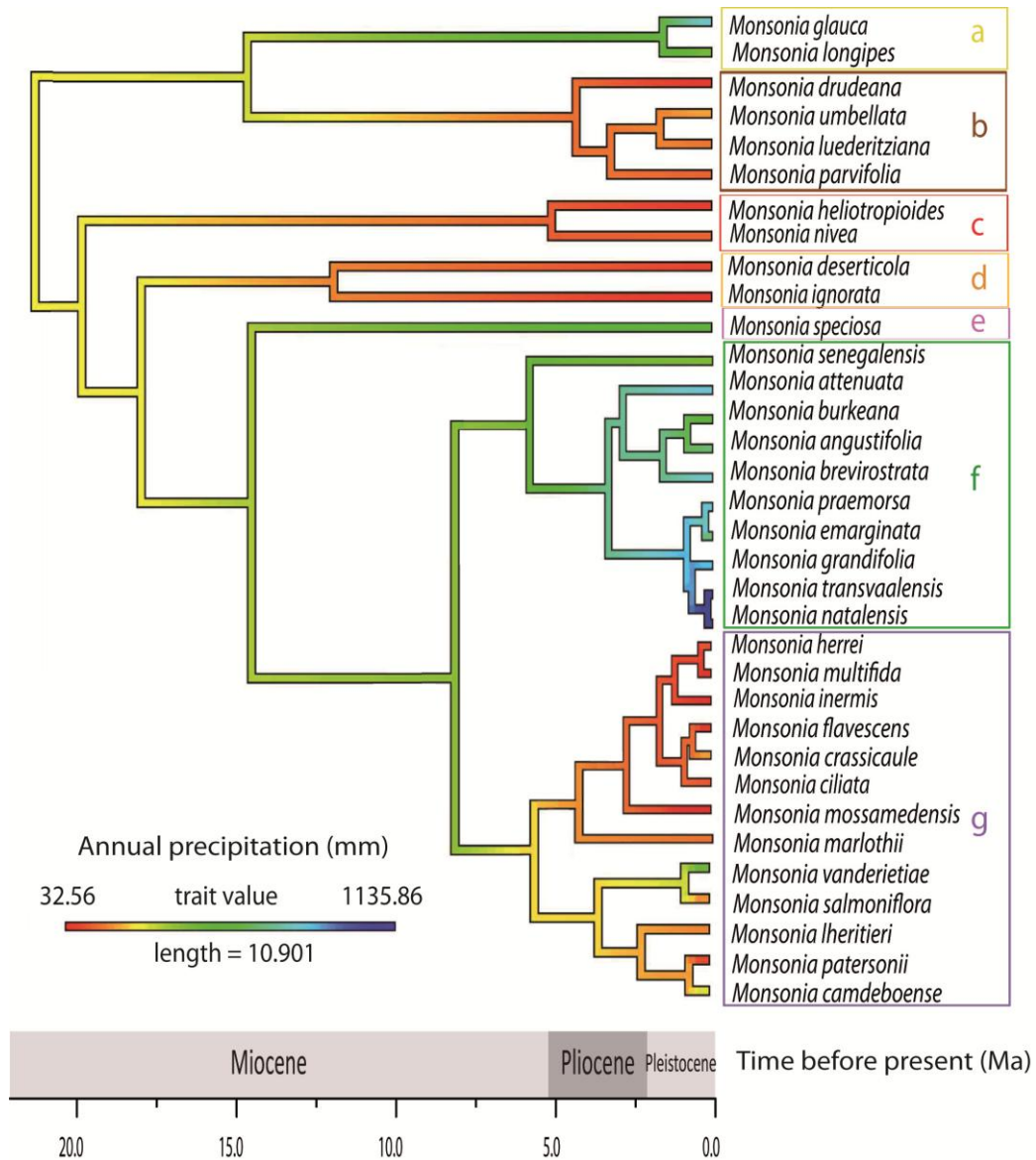


Figure S4. MCC tree of *Monsonia* with shifts in annual precipitation inferred using the R package *phytools* (Revell, 2012) with the Ornstein–Uhlenbeck continuous evolutionary model.

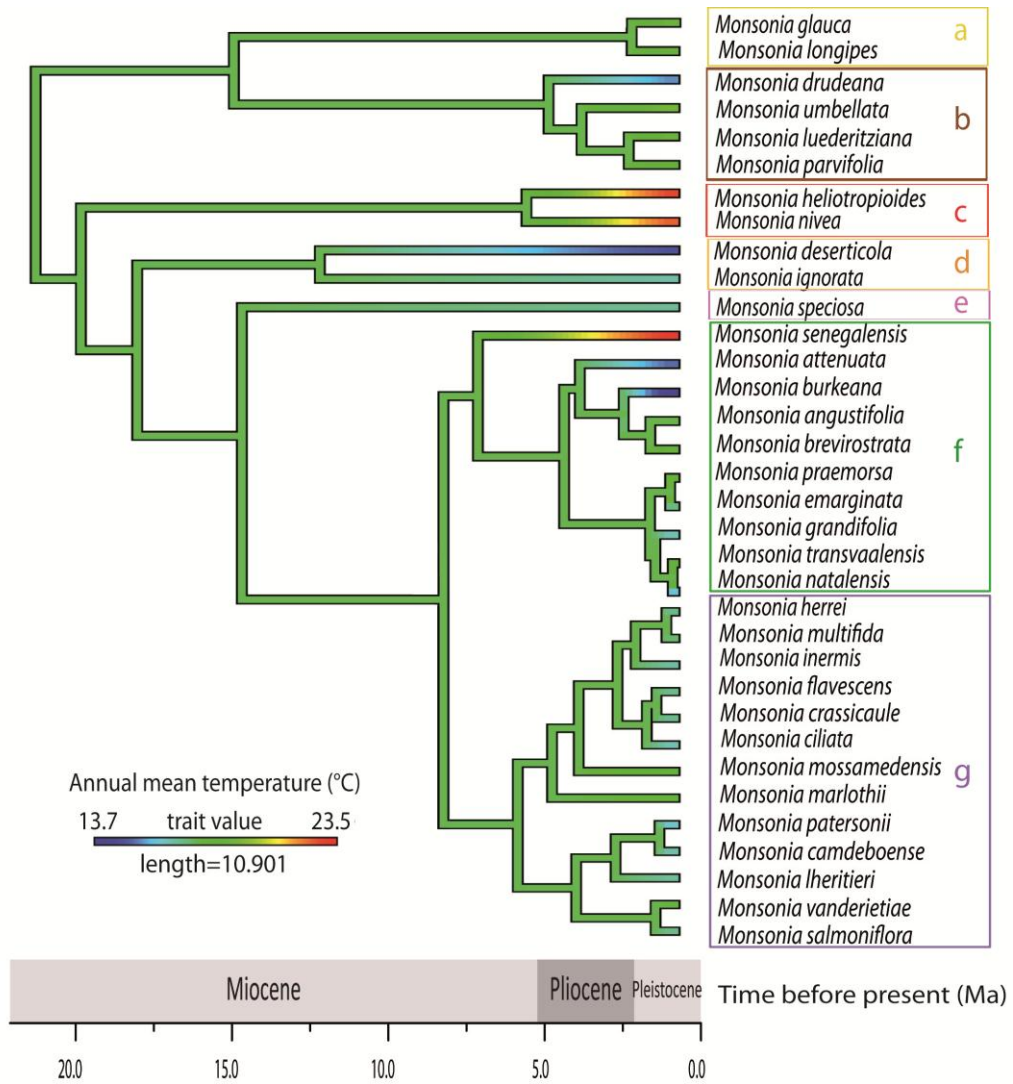


Figure S5. MCC tree of *Monsonia* with shifts in annual mean temperature using the R package *phytools* (Revell, 2012) with the Ornstein–Uhlenbeck continuous evolutionary model.

CAPÍTOL 3

Biogeographic history of Afro-Macaronesian bellflowers (*Azorina*-group, Campanulaceae): searching for climatic refugia and dispersal routes in Africa

Abstract

The aim of the present work is to investigate the evolutionary origins of African bellflowers (the *Azorina*-group of *Campanula*), reconstruct their biogeographic history, and evaluate the role played by life form and past climate changes in the evolution of this lineage.

A complete phylogeny of the *Azorina*-group was inferred with Bayesian phylogenetic analyses based on cpDNA sequences (*petB-petD*, *rpl32-trnL*, *trnS-trnG* and *trnL-trnF*) from 83 individuals, representing different populations of the 23 species that constitute the *Azorina*-group plus 31 taxa belonging to different outgroup levels. Molecular dating was performed for populations and species datasets using Birth and Death processes. We conducted biogeographic modelling to reconstruct ancestral geographic ranges and the direction of main dispersal events. We also inferred life form evolution of *Azorina*-group.

The ancestors of the *Azorina*-group likely dispersed from Asia to Africa through Arabia in the late Miocene (c. 8–12 Ma). Most of the divergence events within this lineage occurred c. 2–3 Ma, coinciding with a general shift to drier climates. Although the highest diversity in the *Azorina*-group is centred in the Maghreb, two lineages migrated during the Pliocene and Pleistocene periods in the opposite direction through Central Saharan massifs, reaching again the Arabian Peninsula and Socotra during more favourable climatic periods for these plants. Pleistocene climatic fluctuations strongly shaped the North African Flora by favouring dispersal events between refugia during favourable periods, and promoting allopatric speciation within refugia during unfavourable ones. Reiterated range expansions and contractions between mountains and lowlands likely contributed to high local speciation and extinction events. These processes lead to separate endemic floras in remote African ranges.

1. Introduction

The flora of North Africa is characterized by a great diversity and singularity, as evidenced by botanical studies (Quézel, 1957, 1978; Monod, 1971; Dobignard & Chatelain, 2010-2013) and by the existence of several regional hotspots of biodiversity (Médail & Quézel, 1997; Véla & Benhouhou, 2007). The exceptional nature of this flora is probably related to palaeogeographic, geologic and climatic factors (Quézel, 1978). Past climatic changes in North Africa such as lowering temperatures during the Early Miocene favoured the expansion of mountain biomes (Coetzee, 1967), while desert conditions in the Sahara probably started c. 7 Ma (Schuster *et al.*, 2006).

The extensive and steep climatic oscillations of the Pliocene and Pleistocene probably caused strong cycles of contraction and expansion of species distribution ranges, and induced differentiation processes of plant populations through dispersal or vicariance (Migliore *et al.*, 2012). Unfavourable climatic episodes likely reduced many plant species ranges to several climatic narrow distribution areas situated in North African ranges (Rif, Atlas, Djurdjura and Kabylie), the Central Saharan massifs (Hoggar, Tassilis and Tibesti massifs), the Eastern African mountains, the Southern Mediterranean peninsulas and Macaronesian archipelagos (Quézel, 1978; Médail & Diadema, 2009; Migliore *et al.*, 2013). A high frequency of dispersal events with a westward direction in North Africa has been reported in several plant lineages (the “Rand Flora” pattern, Sanmartín *et al.*, 2010), but also in animals (Kirk-Spriggs & McGregor, 2009; Brito *et al.*, 2014; Husemann *et al.*, 2014). Some studies have examined the phylogeographic patterns of plant species occurring in North Africa (*Campanula*, Alarcón *et al.*, 2013; *Erica*, Désamoré *et al.*, 2011; *Juniperus*, Terrab *et al.*, 2008; *Myrtus*, Migliore *et al.*, 2012, 2013; *Olea*, Besnard *et al.*, 2009; *Silene*, Naciri *et al.*, 2010). Other case studies illustrate how the highly heterogeneous conditions of the Maghreb region could have favoured rapid population differentiation leading to new endemic taxa, especially in lineages with low dispersal abilities (Naciri *et al.*, 2010; Fernández-Mazuecos & Vargas, 2011; Habel *et al.*, 2012).

The subfamily Campanuloideae encompasses c. 1000 species, is distributed worldwide and shows high species diversity in the Palaeartic region. Its diversification has been estimated after the collision of the Arabian Peninsula with

Eurasia in the late Eocene (c. 35 Ma) (Roquet *et al.*, 2009; Mansion *et al.*, 2012; Crowl *et al.*, 2016). Moreover, the separation of *Trachelium*, *Campanula* s. str. and *Rapunculus* clades occurred during the Middle Miocene in the Mediterranean region (13.7–14.7 Ma; Crowl *et al.*, 2016). Here, we focus on a group of bellflowers belonging to the clade of *Campanula* s. str. that includes species endemic to Macaronesia, the Mediterranean region, East Africa, and southern Arabia, i.e. the *Azorina*-group (Roquet *et al.*, 2008, 2009). Despite the differences in life form, morphology, and breeding system, these species constitute a monophyletic clade (Mansion *et al.*, 2012). Specialization in restricted habitats and low gene flow could explain why some bellflowers are narrow endemics; on the other hand, polyploidy, short life form and autogamy could have favoured wide distributions in other bellflower taxa.

The *Azorina*-group constitute an interesting case study to investigate plant diversification and biogeographic history in North Africa, a key area affected by climatic instability during Pliocene and Pleistocene periods (Médail & Diadema, 2009; Husemann *et al.*, 2014). The complexity of these processes, leading to recent humid-dry cycles, likely caused eastward and westward dispersals in some plant groups (Gonçalves *et al.*, 2012; Alarcón *et al.*, 2013; Metallinou *et al.*, 2015). Exceptionally, in some specific Mediterranean and Atlantic areas of the northern Maghreb the climate stability and the heterogeneous relief may have favoured an increase in diversification (Naciri *et al.*, 2010; Fernández-Mazuecos & Vargas, 2011; Habel *et al.*, 2012; García-Aloy *et al.*, 2017). In the present study, we generate new phylogenetic data and analyse it in combination with biogeographic and ancestral state reconstruction analyses to address the following questions: (1) which are the biogeographic and evolutionary origins of the *Azorina*-group? (2) how have biogeographic distributions evolved within this group? and (3) what factors may have favoured biogeographic range expansions within the *Azorina*-group? Last but not least, given the taxonomic complexity of this group, we include here several samples (from different localities) per species in order to investigate whether each species of the *Azorina*-group is truly monophyletic.

2. Materials and Methods

2.1. Study group and taxon sampling

With the aim to clarify the phylogenetic relationships of all *Campanula* species classified as belonging to the *Azorina*-group, we sampled all 23 species of the *Azorina*-group, five Asian relatives (*C. cashmeriana* Royle, *C. dimorphantha* Schweinf., *C. incanescens* Boiss., *C. lehmanniana* Bunge, and *C. polyclada* Rech.f. & Schiman-Czeika), eight species of the subgenus *Roucela*. According to Olesen *et al.* (2012) and Mansion *et al.* (2012), as outer outgroup we included *Feeria angustifolia* (Schousb.) Buser, *Trachelium caeruleum* L., *Diosphaera rumeliana* (Hampe) Bornm., five species of the *Campanula* subg. *Rapunculus*, seven taxa belonging to *Campanula* subg. *Campanula*, and three species of *Campanula* gr. *Trachelium*. Due to the taxonomic and biogeographic complexity of *Azorina*-group, we conducted an extensive geographic sampling (i.e. Africa, Arabia and Macaronesia), which allowed us to conduct biogeographic analyses at two different levels: species and populations, and check the monophyly of controversial species. In total, we sampled 83 individuals (each from a different population; Table S1) of 23 species of *Azorina*-group plus nine outgroup species.

2.2. DNA sequencing and phylogenetic inference

Total DNA was extracted from silica gel-dried plant tissue or herbarium material using the “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN Inc., California, USA) according to manufacturer’s instructions. Four highly variable cpDNA regions were sequenced: *petB*¹³⁶⁵-*petD*⁷³⁸, *rpl32-trnL*^{UAG}, *trnL*^{UAA}-*trnF*^{GAA} and *trnS*^{GCU}-*trnG*^{UCC} producing 61, 63, 61 and 63 new sequences respectively (Table S1). We also sequenced the nuclear marker ITS (52 new sequences). Additionally, we added 17 ITS sequences, 40 *petB-petD* sequences, 24 *rpl32-trnL* sequences, 35 *trnL-trnF* sequences, and 28 *trnS-trnG* sequences available in GenBank. Voucher information and GenBank accession numbers are detailed in Table S1.

Sequences of each region were aligned with MAFFT v. 5 (Kato *et al.*, 2005) and checked by eye using BioEdit v. 7.2 (Hall, 1999). Phylogenetic analyses were performed on separate datasets for each region and on a concatenated dataset. The congruence among results of different markers was tested. We determined the best fitting model of sequence evolution for each region with the Akaike

Information Criterion (AIC) using jModeltest v. 2.2 (Posada, 2008). Bayesian inference (BI) was carried out under the GTR + Γ model for plastid markers using BEAST v. 1.6.0 (Drummond & Rambaut, 2007).

2.3. Dating analyses of the *Azorina*-group

A relaxed clock method with uncorrelated rates drawn from a lognormal distribution was used to reconstruct divergence times using BEAST. The species and the population datasets were analysed under GTR+ Γ model applying the auto-optimisation option, random starting trees and Birth and Death process as tree prior. A secondary calibration of 12 ± 2 Ma was assigned to the split between *Roucela* and the *Azorina*-group, based on dating analyses of Olesen *et al.* (2012), assuming a normal distribution. We conducted four runs of 10^8 generations each, sampling every 1000th generation. The resulting posterior distributions were checked using Tracer v. 1.4.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Four analyses were combined using LogCombiner v. 1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007), and the maximum clade credibility (MCC) tree from the BEAST analysis was calculated using Tree Annotator v. 1.6 (Drummond & Rambaut, 2007) after removing a burn-in of 20%.

2.4. Biogeographic reconstructions

Historical biogeography of the *Azorina*-group was inferred using the R package *BioGeoBEARS* (Matzke, 2014). The input tree was the MCC tree obtained from the BEAST analysis. Eight distribution areas were defined: Asia; Azores Islands; Canary Islands; Cape Verde Islands; Central Saharan massifs; East Africa, Arabia and Socotra; Iberian and Italian peninsulas, Sicily and Balearic Islands; north-west Africa. All available models in *BioGeoBEARS* were fitted and compared based on AIC; final biogeographic reconstruction was performed with the model that yielded the lowest AIC, the dispersal-extinction-cladogenesis model (DEC). Areas were defined based on the location of areas harbouring endemic species of *Campanula*. Putative refugia were inferred based on the total number of endemics per area and the dispersal/migration corridors were deduced from the dispersal events between areas inferred in DEC.

In order to reconstruct the dispersal events that took place in the *Azorina*-group in a spatial diffusion framework, we conducted a Bayesian phylogeographic analysis in BEAST v. 1.8 (Lemey *et al.*, 2009; Drummond *et al.*, 2012). This analysis was based on *rpl32-trnL* and *trnS-trnG* sequences of all individuals sampled in the *Azorina*-group species. One individual of *C. cashmeriana* and one of *C. lehmanniana* were also included as outgroup based on previous phylogenetic results. We used the same eight distribution areas of the *BioGeoBEARS* analysis, which were mapped using a discrete phylogeographic analysis (DPA, Lemey *et al.*, 2009) that models spatial diffusion as a continuous-time Markov chain process along phylogenies. To identify parsimonious descriptions of the diffusion process, we employed the Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS). We implemented an uncorrelated lognormal relaxed clock, and birth-death process was used as tree prior. The best-fitting substitution model was GTR, selected using the Akaike information criterion in jModelTest v. 2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012).

For partial diffusion analyses of *C. edulis* and *C. keniensis* clades, the calibration dates were based on previously estimated divergence times. An exponential prior with mean equal to 1 was implemented for the location state rate. Four Monte Carlo Markov Chain (MCMC) analyses were run for 10 million generations, sampling every 1000th generation. Analysis with Tracer v. 1.4.1 confirmed adequate sample sizes. The four runs were combined using LogCombiner v. 1.8 after discarding the first 10% of sampled generations as burn-in. Trees were summarized in a MCC tree obtained in TreeAnnotator v. 1.8. Finally, Bayes factors (BFs) were calculated in SPREAD v. 1.0.6 (Bielejec *et al.*, 2011) to identify statistically supported diffusion routes. Routes yielding a $BF > 3$ were considered as well supported (Lemey *et al.*, 2009)

2.5. *Life form evolution*

The evolution of the habit (annual or perennial) was mapped onto the tree with the best likelihood score obtained from the Bayesian analysis using maximum likelihood (ML) in Mesquite v. 2.0 (Maddison & Maddison 2007), and considering only categorical states. Species with controversial or unknown states were pruned from the tree (but preserving branch lengths) with the function *drop.tip* in the R package *ape* (Paradis *et al.*, 2004). ML reconstructions were analysed under a

single-rate Mk likelihood model for discrete morphological characters as described by Lewis (2001).

3. Results

3.1. *Geographic distribution and endemic species of the Azorina-group*

Most *Campanula* species included in the *Azorina*-group are distributed in north-west Africa (15 species, including 12 endemic), and secondarily in Macaronesia (3 species, all endemic), the eastern African ranges, the Arabian ranges and Socotra (4 species, all endemic), and the Central Saharan massifs (2 species, both endemic), and finally in the Mediterranean peninsulas (3 species, none endemic) (Fig. 1, Table S2).

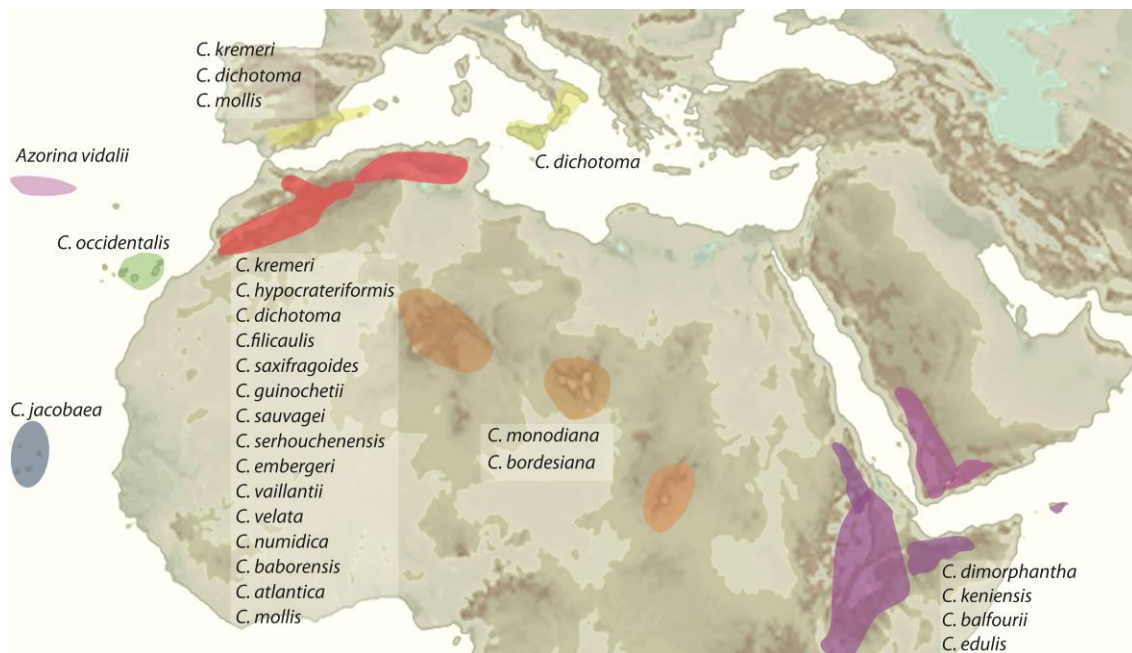


Figure 1. Areas of distribution for the *Azorina*-group of bellflowers, showing the codification used in the biogeographic analyses: Azores Islands (pink), Canary Islands (green), Cape Verde Islands (pale blue), Southern Iberian Peninsula, Balearic Islands, Sicilia and southern Italian Peninsula (yellow), north-west Africa (red), Central Saharan massifs (orange), and the Eastern Africa, Arabian Peninsula and Socotra (violet).

3.2. *Phylogenetic and historical biogeography reconstructions*

Bayesian analyses of combined plastid markers yielded highly statistical support in all the nodes (Fig. 2) and coincident topologies for both population and species datasets (Figs. 2 & 3). The phylogenetic tree obtained with ITS had poor resolution and low posterior probabilities for most clades (results not shown).

Consequently, we decided not to concatenate it with the plastid dataset. Within the *Azorina*-group, six major clades (lineages *a–f*) were recovered (Table S2, Figs. 3 & 4). *Azorina vidalii* diverged c. 10 Ma (6.1–13.2 Ma), probably from a North African ancestor (Fig 3). Lineage *a* diverged from the rest (lineages *b–f*) c. 7.6 Ma (4.4–11.0 Ma), and it includes *C. kremeri* (north-west Africa and south Iberian Peninsula) and *C. occidentalis* (Canary Islands), which likely originated from a north-western African ancestor 5.7 Ma (2.8–8.7 Ma). *Campanula kremeri* probably dispersed c. 1.3 Ma from the Rif to the Iberian Peninsula (Figs. 3 & 4).

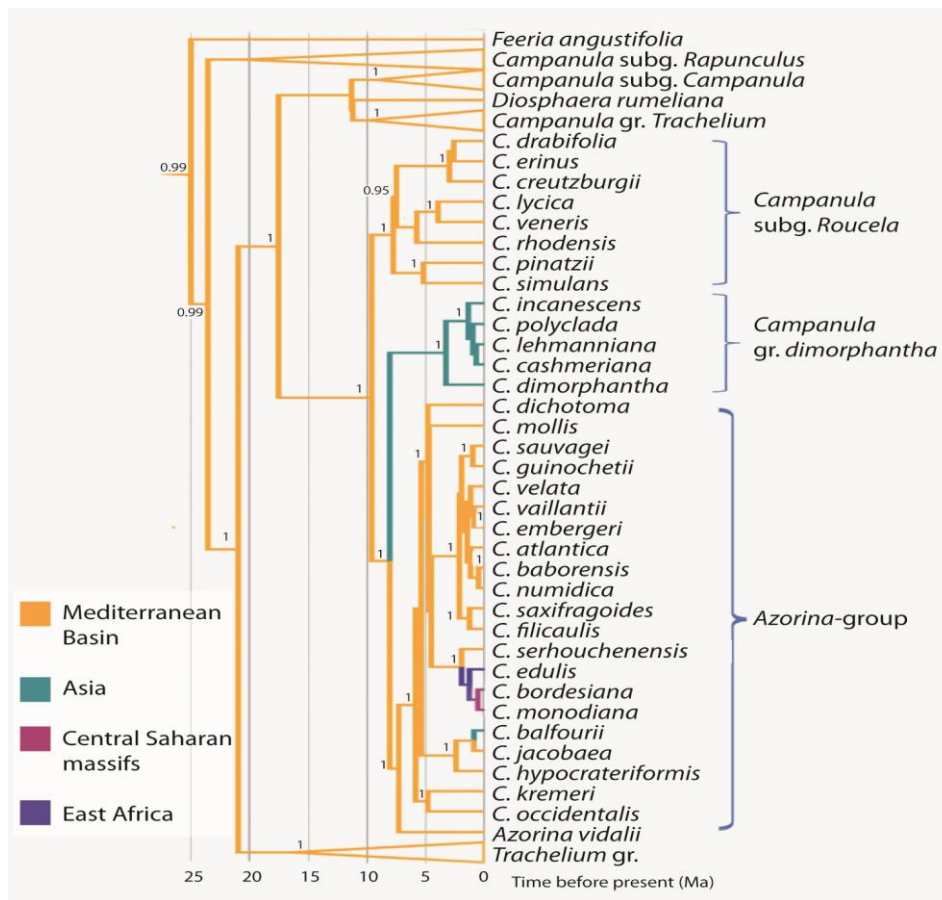


Figure 2. MCC tree using plastid markers of all outgroups, the closest species and the populations included in the *Azorina*-group.

The next ancestor split into lineages *b–f*, in the Late Miocene c. 6.5 Ma (3.4–9.6 Ma), likely in North Africa. Lineage *b* comprises four species: *C. balfourii*, *C. hypocrateriformis*, *C. jacobaea*, and *C. keniensis*, with two large East-West disjunctions: *C. keniensis* (Kenya) diverged c. 2.5 Ma from *C. hypocrateriformis* (Anti-Atlas, south-western Morocco), while the Socotran endemic *C. balfourii* diverged from *C. jacobaea* (endemic of Cape Verde) c. 1.2 Ma.

The ancestors of lineages *c-f* likely originated in north-western Africa 4.6 Ma (2.3–7.1 Ma). All populations of *Campanula dichotoma* constitute lineage *c*, this species occurs from north-western Morocco to Ibiza (Balearic Islands), and its ancestral origin could be north-western Africa.

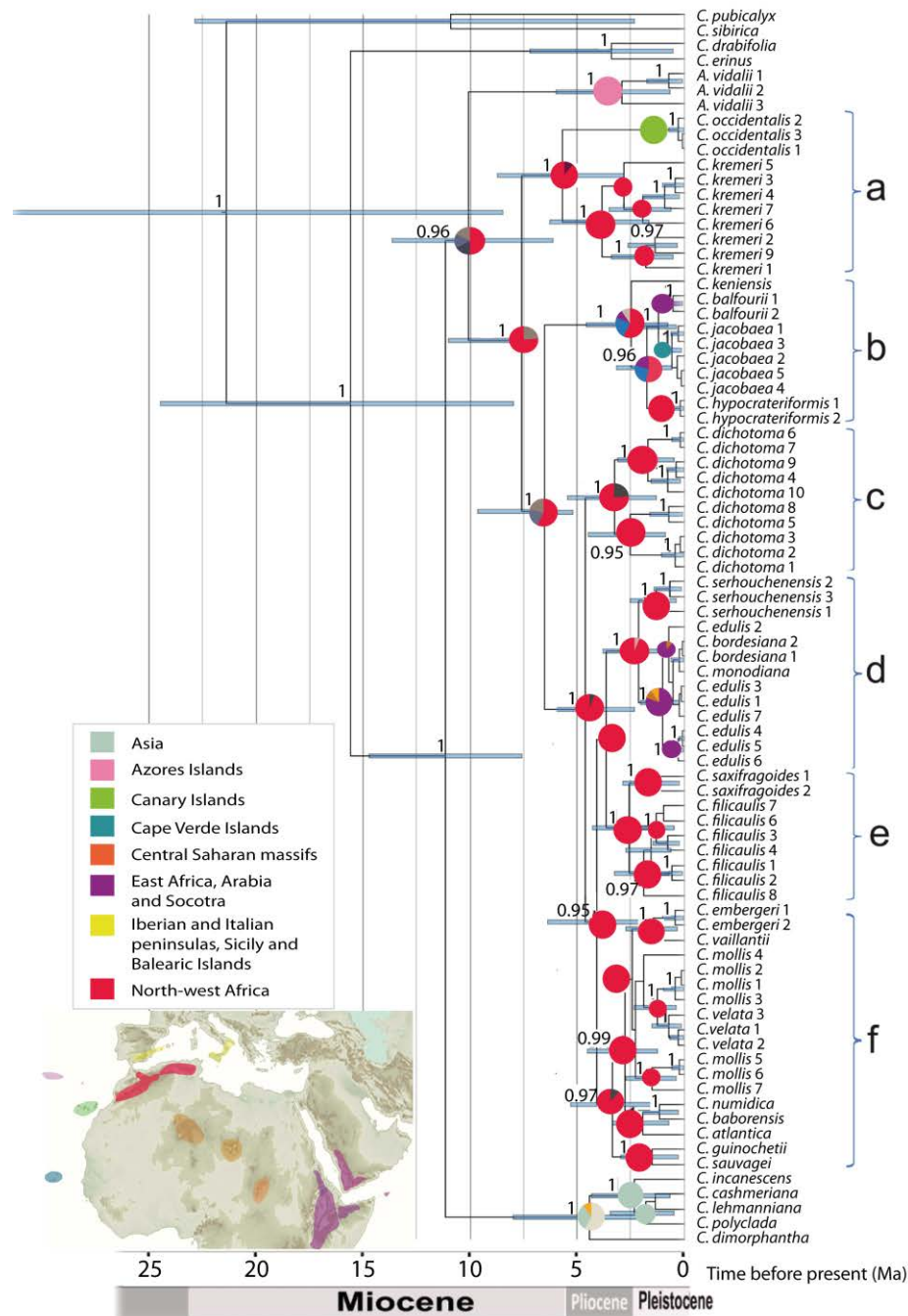


Figure 3. MCC time-calibrated tree of the *Azorina*-group implemented in BEAST using only one accession per species. Numbers above branches indicate the posterior probabilities and blue bars represent the posterior distribution of divergence-time estimates. Biogeographic reconstruction was inferred with the DEC model implemented in BioGeoBEARS (see colour legend). The main lineages are indicated with letters.

A large East-West disjunction can be observed within lineage *d*, involving *C. serhouchenensis* from the Middle Atlas in Morocco and *C. edulis*, spreading up to the eastern African and Arabian massifs around 2.1 Ma (0.7–3.8 Ma). The back-colonization of Central Saharan massifs by *C. bordesiana* and *C. monodiana* ancestors was recent, c. 1 Ma (Figs. 3 & 4).

Lineage *e* is formed by two species located in the Atlas and the Rif (*C. filicaulis* and *C. saxifragoides*), which diverged c. 2.5 Ma. The clade of *f* diversified within north-west Africa from 4.1 Ma onwards and comprises nine species (Figs. 3 & 4). The Iberian clade of *C. mollis* was strongly supported as paraphyletic, remaining the African populations nested in a different clade (Fig. 3). We decided to keep these two lineages (Iberian and African) as if they were independent species. Further detailed research is needed to unravel whether *C. mollis* deserves to be split into two species.

3.3 **BSSVS analyses of migration routes in Africa**

The discrete phylogeographic analyses based on two plastid *rpl32-trnL* and *trnS-trnG* markers, using BSSVS show dispersals from west to east and vice versa on both sides of the Sahara desert, and connecting also the Central Saharan massifs (Hoggar and Tibesti), in the case of lineage *d* (Figs. 4 & 5). This migration route is supported considering the BF tests: several colonisation events occurred among the Maghreb or Cape Verde and the East African-Arabian ranges and Socotra. Most of these dispersal events coincided c. 2.5–3 Ma (Fig. 5).

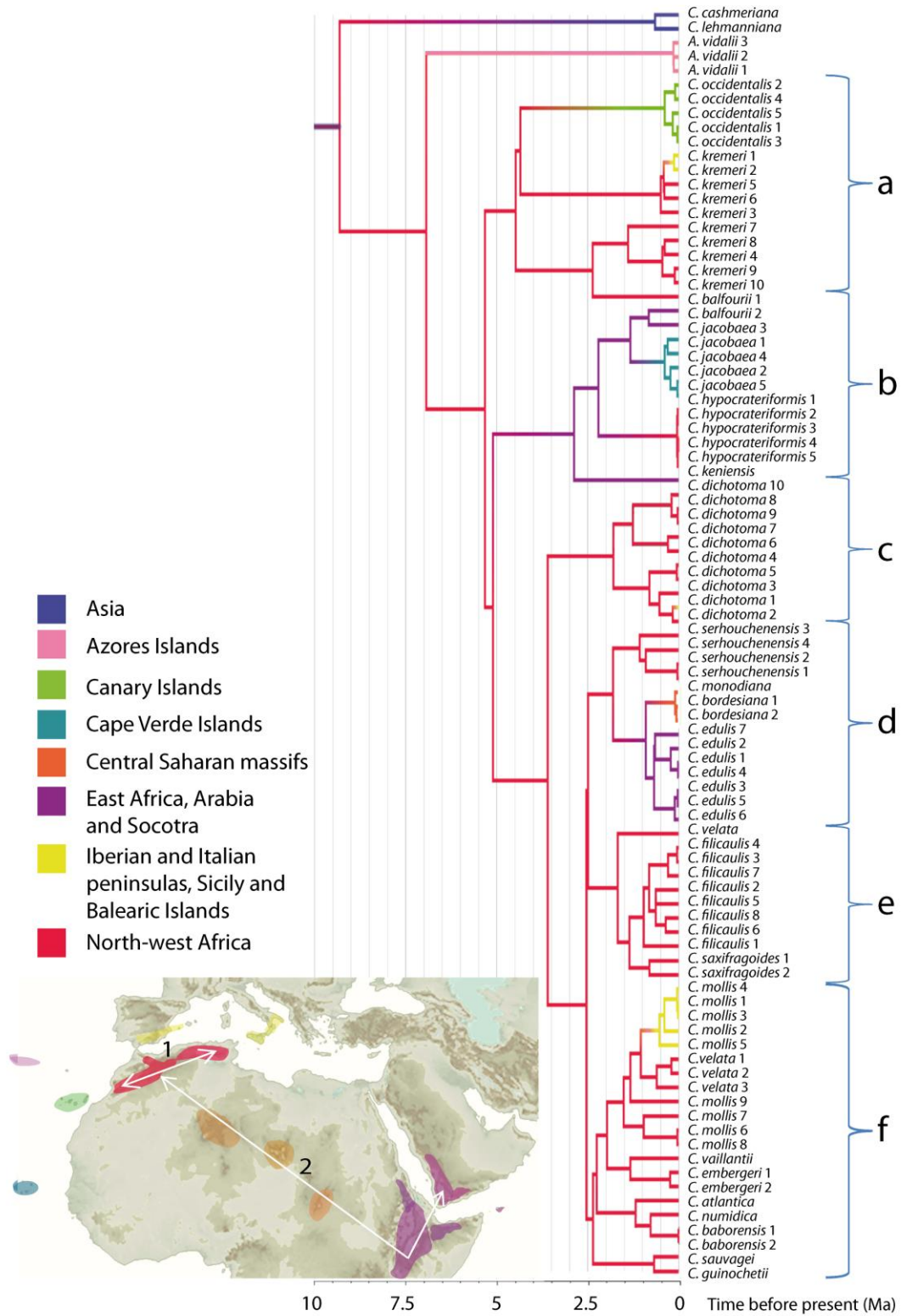


Figure 4. Phylogeny of all populations included in the *Azorina*-group and DPA analysis performed using the Lemey *et al.* (2009) method. Branch colours refer to areas as pictured in the lower left map (see also colour legend).

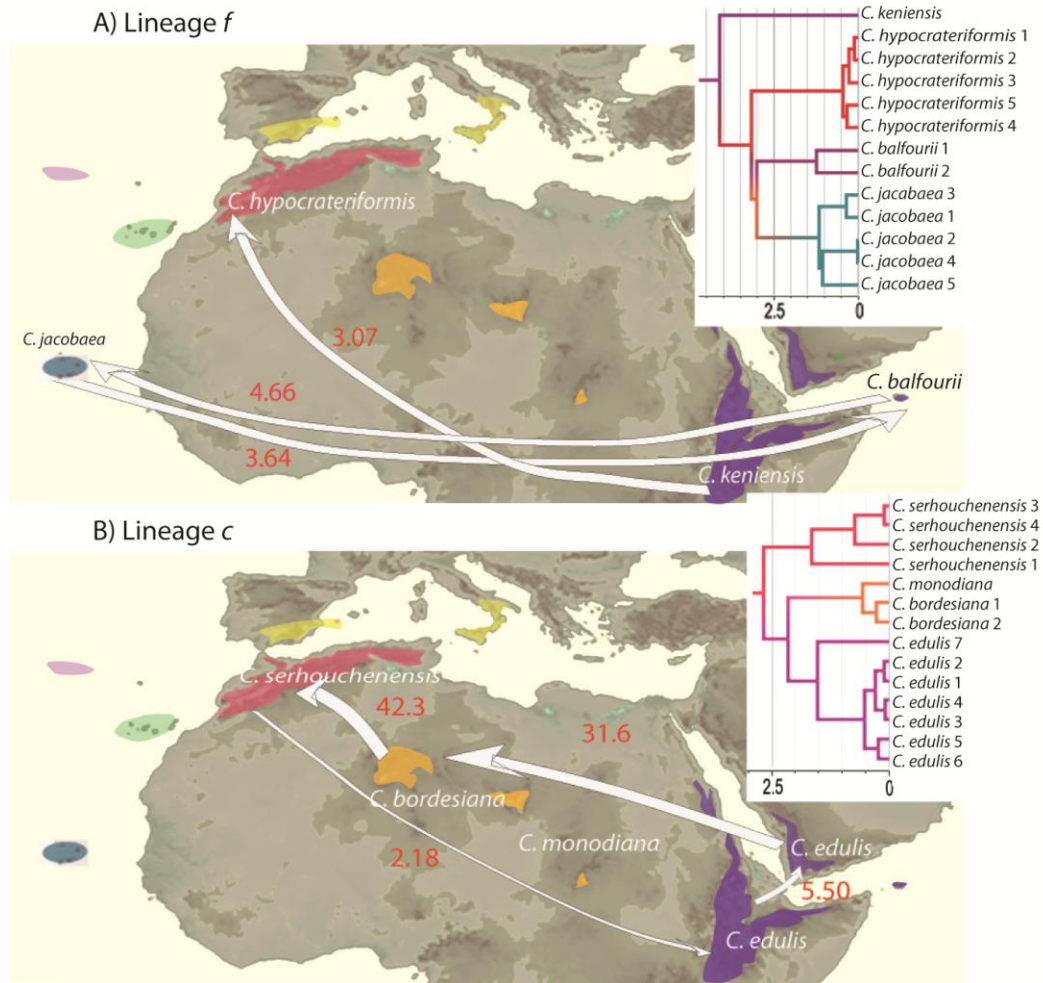


Figure 5. Time-calibrated tree with the biogeographic areas and map representing the distribution of species and BSSVS analysis of the two groups distributed across Africa (lineages *c* and *f*). Branch colour indicates the ancestral range with the highest posterior probability for each lineage. Numbers beside arrows branches indicate the Bayesian posterior probability. The arrows indicate inferred dispersal events and the numbers beside the arrows indicate Bayes Factor (BF) support.

3.4 Habitat and life form evolution

The root of *Azorina*-group was inferred to be of annual (Fig. S1). At least three shifts from the annual life form to the perennial have occurred according to the reconstruction: i) in the ancestor of *Azorina vidalii*, ii) in the ancestor *C. jacobaea*, and iii) in the common ancestor of all other perennial species (lineages *d*–*f*). Most species included in the basal clades *a*–*d* are annuals with medium (*C. dichotoma*, *C. hypocraeteriformis*) or small corollas (*C. kremeri*, *C. occidentalis*, *C. keniensis*, *C. balfourii*).

The annual taxa grow generally in eroded and disturbed slopes or meadows. Perennials such as *C. filicaulis* grow in disturbed or nitrified meadows; *C.*

edulis and *C. bordesiana* grow in wet slopes in mountains and rocky cliffs, while their sister species, *C. serhouchenensis*, grows only in rocky cliffs. Other species, such as those included in lineage *g*, are rupicolous and generally occupy specialised habitats such as limestone cliffs (Table S2).

4. Discussion

4.1. Colonisation of Africa and the origins of Azorina-group

The sister group of the *Azorina*-group is constituted by the Central Asian group of *C. dimorphantha* (Fig. 2; Mansion *et al.*, 2012). *Campanula dimorphantha* is a coloniser that inhabits wet disturbed places in Asia (e.g. in the Himalayas, China and Taiwan) and in Africa, where it is distributed along the Nile shore and the Red Sea coast (Figs. 2 & 3; Thulin, 1987). The ancestors of the *Azorina*-group probably dispersed from West Asia and to North Africa c. 8–10 Ma (Figs. 2, 3 & 4). Similarly, the dispersal route from Asia to Africa has been reported in other plant groups such as *Isodon* (Yu *et al.*, 2014) and *Canarina* (Mairal *et al.*, 2015).

Later, some ancestors of the *Azorina*-group may have persisted in the Azores, while others survived in north-western Africa refuge areas as the Atlas and the Rif (Schaefer *et al.*, 2011; Mansion *et al.*, 2012; Alarcón *et al.*, 2013). The colonisation of the Azores by the ancestors of *Azorina vidalii* could start in the oldest islands (e.g. Santa Maria, 8.1 Ma), though previous studies suggest this island was only habitable after 5.5 Ma (Serralheiro & Madeira, 1993; Schaefer *et al.*, 2011). Interestingly, the coastal *A. vidalii* presents a weak genetic isolation, suggesting that dispersal events among islands could have taken place (Schaefer *et al.*, 2011).

4.2. Location of refugia in North Africa and putative dispersal corridors

Refugia are climatically stable areas where species or contrasted genetic lineages have differentiated allopatrically after drastic climatic events, as glacial episodes (Table S3). We found a strong spatial congruence between the *Campanula* refugia and those reported by Médail & Diadema (2009). These regions are generally located in mountain ridges or groups of islands, mainly in the Maghreb massifs (Atlas, Rif, and Tell ranges) and secondarily in Macaronesia and in the rest of African ranges. The mountains and plateaus of East Africa and Arabia have been

described as refugia because they harbour a large number of species (Hedberg, 1970; Levinsky *et al.*, 2013). These refuges served as sources for coloniser species that spread in several directions during mesic periods (Quézel, 1978). Our biogeographic analyses allowed us to infer two main migration corridors that enabled dispersal and range expansions within the *Azorina*-group: one across the West-East Maghreb ranges, and another between north-western Africa and the East of Africa and Arabia.

The first corridor across the Maghreb (Fig. 4, corridor 1) is dated around 2.8–3.2 Ma, after the onset of the Mediterranean climate and coinciding with the aridification peak at 2.4–2.9 Ma (De Menocal, 2004). It also facilitated the dispersal by wind to Macaronesia and southern European islands and peninsulas. These four dispersals to Europe are relatively recent, at 0.4–1.3 Ma. Two lineages, *c* and *f*, followed this corridor. Lineage *c* is formed by *C. dichotoma* which could have expanded from the Tell to the Rif and from there to the Atlas and finally reaching the Iberian Peninsula. Lineage *f* presents a high number of range-restricted endemics growing in the Atlas, Rif and Tell mountains, with a noticeable morphological differentiation. They are rupicolous, grow on limestone cliffs, and present relatively small and isolated populations (Table S2). Geographic or habitat barriers between upland areas with limestone cliffs could have promoted genetic structuring in these populations, sometimes leading to allopatric differentiation (Naciri *et al.*, 2010; Ben Faleh *et al.*, 2012). The origin of lineage *f* was inferred in the Atlas mountains, followed by a northwards expansion, reaching the Iberian Peninsula (Fig. 4).

The second inferred dispersal corridor is much longer, extending across the Sahara from north-west Africa to East Africa and Arabia. The Central Saharan massifs probably played an important role as migratory stepping stones across this corridor (Figs. 4 & 5, corridor 2; lineages *b* and *d*). Our data suggest rapid range expansions in these two lineages, dated around 1.2–2.5 Ma (Table S3, Figs. 4 & 5). However, both lineages show different biogeographic patterns: lineage *d* shows relict populations scattered across this dispersal corridor (in the Central Saharan massifs), while lineage *b* shows no known intermediate population. It is possible that extinct sister groups had once a wider distribution across North Africa (Tables S2 & S3, Figs. 4 & 5).

Short life form and selfing could also have favoured expansion across a large geographic range (Lavergne *et al.*, 2013). Major expansions have been featured in three lineages formed by annuals: *C. kremeri* (lineage *a*) and *C. dichotoma* (lineage *c*), widely distributed across Maghreb, Iberia and Sicily, and *C. keniensis*, *C. balfourii*, *C. jacobaea* and *C. hypocrateriformis* (lineage *b*) distributed across Africa. The Afro-macaronesian bellflowers seem to have successfully adapted to the varied and unstable habitats of North Africa, thanks to a combination of cytogenetic and physiological features, i.e. flexibility in chromosomic number and ploidy level, ability to tolerate a variety of habitats and substrates, and autogamous or facultative autogamous reproductive systems linked to short life form (Nyman, 1991, 1992; Blanco-Pastor & Vargas, 2013; Lavergne *et al.*, 2013). East to West and latitudinal colonisation routes have been described in several taxa, e.g. *Myrtus nivellei* and *M. communis* (Migliore *et al.*, 2012), *Erica arborea* (Désamoré *et al.*, 2011), and *Olea europaea* (Besnard *et al.*, 2007, 2009). The same West to East expansion routes were followed by the ancestors of lineages *b* and *d* in recent periods, suggesting a biogeographic pattern formed by refugia linked by expansion routes (Besnard *et al.* 2007, 2009; Désamoré *et al.*, 2011; Migliore *et al.*, 2012, 2013; Alarcón *et al.*, 2013; Brito *et al.*, 2014).

References

- Alarcón, M., Roquet, C., García-Fernández, A., Vargas, P. & Aldasoro, J. J. (2013) Phylogenetic and phylogeographic evidence for a Pleistocene disjunction between *Campanula jacobaea* (Cape Verde Islands) and *C. balfourii* (Socotra). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, 828–836.
- Ben Faleh *et al.* (2012) Phylogeography of the Greater Egyptian Jerboa (*Jaculus orientalis*) (Rodentia: Dipodidae) in Mediterranean North Africa. *Journal of Zoology*, **286**, 208–220.
- Besnard, G., Rubio de Casas, R. & Vargas, P. (2007) Nuclear and plastid DNA polymorphism reveals large-scale reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea* L.). *Journal of Biogeography*, **34**, 736–752.
- Besnard, G., Rubio de Casas, R., Christin, P. A. & Vargas, P. (2009) Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences:

- Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. *Annals of Botany*, **104**, 143–160.
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. A. & Lemey, P. (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, **27**, 2910–2912.
- Blanco-Pastor, J. L. & Vargas, P. (2013) Autecological traits determined two evolutionary strategies in Mediterranean plants during the Quaternary: low differentiation and range expansion versus geographical speciation in *Linaria*. *Molecular Ecology*, **22**, 5651–5668.
- Brito, J. C. *et al.* (2014) Unravelling biodiversity, evolution and threats to conservation in the Sahara-Sahel. *Biological Reviews*, **89**, 215–231.
- Coetzee, J. A. (1967) Pollen analytical studies in east and southern Africa. *Palaeoecologia of Africa*, **3**, 1–146.
- Crowl, A. A. *et al.* (2016). A global perspective on Campanulaceae: Biogeographic, genomic, and floral evolution. *American Journal of Botany*, **103**, 233–245.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**, 772.
- De Menocal, P. B. (2004) African climate change and faunal evolution during the Pliocene-Pleistocene. *Earth and Planetary Science Letters*, **220**, 3–24.
- Désamoré, A. *et al.* (2011) Out of Africa: north-westwards Pleistocene expansions of the heather *Erica arborea*. *Journal of Biogeography*, **38**, 164–176.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29**, 1969–1973.
- Fernández-Mazuecos, M. & Vargas, P. (2011) Genetically depauperate in the continent but rich in oceanic islands: *Cistus monspeliensis* (Cistaceae) in the Canary Islands. *PLoS ONE*, **6**, e17172.
- García-Aloy, S. *et al.* (2017) North-west Africa as a source and refuge area of plant biodiversity: a case study on *Campanula kremeri* and *Campanula occidentalis*. *Journal of Biogeography*. doi:10.1111/jbi.12997

- Gonçalves, D. V. (2012) Phylogeny of North African *Agama* lizards (Reptilia: Agamidae) and the role of the Sahara desert in vertebrate speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **64**, 582–591.
- Habel, J. C. (2012) Microallopatry caused strong diversification in *Buthus scorpions* (Scorpiones: Buthidae) in the Atlas Mountains (NW Africa). *PLoS ONE*, **7**, e29403.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Hedberg, O. (1970) Evolution of the Afroalpine flora. *Biotropica*, **2**, 16–23.
- Husemann, M., Schmitt, T., Zachos, F. E., Ulrich, W. & Habel, J. C. (2014) Palaeartic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaeartic biota. *Journal of Biogeography*, **41**, 81–94.
- Katoh, K., Kuma, K. I., Toh, H. & Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, **33**, 511–518.
- Kirk-Spriggs, A. H. & McGregor, G. (2009) Disjunctions in the *Diptera* (Insecta) fauna of the Mediterranean Province and southern Africa and a discussion of biogeographical considerations. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, **64**, 32–52.
- Lavergne, S., Hampe, A. & Arroyo, J. (2013) In and out of Africa: how did the Strait of Gibraltar affect plant species migration and local diversification? *Journal of Biogeography*, **40**, 24–36.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J. & Suchard, M. A. (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol*, **5**, e1000520.
- Levinsky, I. (2013) Climate envelope models suggest spatiotemporal cooccurrence of refugia of African birds and mammals. *Global Ecology and Biogeography*, **22**, 351–363.
- Maddison, W. & Maddison, D. (2007) *Mesquite 2. A Modular System For Evolutionary Analysis*.
- Mairal, M., Pokorny, L., Aldasoro, J. J., Alarcón, M. & Sanmartín, I. (2015) Ancient vicariance and climate-driven extinction explain continental-wide

- disjunctions in Africa: the case of the Rand Flora genus *Canarina* (Campanulaceae). *Molecular Ecology*, **24**, 1335–1354.
- Mansion, G. (2012) How to Handle Speciose Clades? Mass Taxon-Sampling as a Strategy towards illuminating the Natural History of *Campanula* (Campanuloideae). *PLoS ONE*, **7**, e50076.
- Matzke, N. J. (2014) Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. *Systematic Biology*, **63**, 951–970.
- Médail, F. & Quézel, P. (1997) Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **84**, 112–127.
- Médail, F. & Diadema, K. (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.
- Metallinou, M. (2015) Species on the rocks: systematics and biogeography of the rock-dwelling *Ptyodactylus geckos* (Squamata: Phyllodactylidae) in North Africa and Arabia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **85**, 208–220.
- Migliore, J., Baumel, A., Juin, M. & Médail, F. (2012) From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography*, **39**, 942–956.
- Migliore, J. *et al.* (2013) Surviving in mountain climate refugia: New insights from the genetic diversity and structure of the relict shrub *Myrtus nivellei* (Myrtaceae) in the Sahara desert. *PLoS ONE*, **8**, e73795.
- Monod, T. (1971) Remarques sur les symétries floristiques des zones sèches nord et sud en Afrique. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, **10**, 375–423.
- Naciri, Y., Cavat, F. & Jeanmonod, D. (2010) *Silene patula* (Siphonomorpha, Caryophyllaceae) in North Africa: a test of colonisation routes using chloroplast markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 922–932.
- Nyman, Y. (1991) Crossing experiments within the *Campanula dichotoma* group (Campanulaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **177**, 185–192.
- Nyman, Y. (1992) Pollination mechanisms in six *Campanula* species (Campanulaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **181**, 97–108.

- Olesen, J. M., Alarcón, M., Ehlers, B. K., Aldasoro, J. J. & Roquet, C. (2012) Pollination, biogeography and phylogeny of oceanic island bellflowers (Campanulaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **14**, 169–182.
- Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, **20**, 289–290.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.
- Quézel, P. (1957) Peuplement végétal des hautes montagnes de l'Afrique du Nord. *Encyclopédie biogéographique et écologique*, **10**, 1–463.
- Quézel, P. (1978) Analysis of the flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **65**, 479–534.
- Roquet, C. *et al.* (2008) Natural delineation, molecular phylogeny and floral evolution in *Campanula*. *Systematic Botany*, **33**, 203–217.
- Roquet, C. *et al.* (2009) Reconstructing the history of Campanulaceae with a Bayesian approach to molecular dating and dispersal-variance analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**, 575–587.
- Sanmartín, I., Anderson, C. L., Alarcón, M., Ronquist, F. & Aldasoro, J. J. (2010) Bayesian island biogeography in a continental setting: the Rand Flora case. *Biology Letters*, **6**, 703–707.
- Schaefer, H. *et al.* (2011) The Linnean shortfall in oceanic island biogeography: a case study in the Azores. *Journal of Biogeography*, **38**, 1345–1355.
- Schuster, M. *et al.* (2006) The age of the Sahara Desert. *Science*, **311**, 821.
- Serralheiro, A. & Madeira, J. (1993) Stratigraphy and geochronology of Santa Maria Island (Azores). *Açoreana*, **7**, 575–592.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30**, 1312–1313.
- Terrab, A., Schönswetter, P., Talavera, S., Vêla, E. & Stuessy, T. F. (2008) Range-wide phylogeography of *Juniperus thurifera* L., a presumptive keystone species of western Mediterranean vegetation during cold stages of the Pleistocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**, 94–102.
- Thulin, M. (1987) Notes on *Campanula dimorphantha* (Campanulaceae). *Nordic Journal of Botany*, **7**, 419–420.

- Véla, E. & Benhouhou, S. (2007) Evaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *Comptes-Rendus Biologies*, **330**, 589–605.
- Yu, X. Q. *et al.* (2014) Phylogeny and historical biogeography of *Isodon* (Lamiaceae): Rapid radiation in south-west China and Miocene overland dispersal into Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **77**, 183–194.

Supplementary Information

Table S1. Localities of the sampled populations of *Campanula*, *Azorina*-group and outgroup. GenBank accession numbers. Numbers in bold indicate the new sequences obtained in this work. Dashes (-) indicate missing information.

Species, habitat	N ^o	Locality	DNA regions				
			<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>petB-petD</i>	ITS
<i>Feeria angustifolia</i> (Schousb.) Buser		Morocco, Beni Mellal, road 508 between Afrouer and Bir-el-Quidane R. Vogt 11946, CAM226 (B)	EF088780	-	-	JX914795	AY331467, AY322054
<i>Campanula</i> subg. <i>Rapunculus</i>							
<i>Adenophora remotiflora</i> (Siebold & Zucc.) Miq.		Kim <i>et al.</i> (2016) Complete chloroplast genome sequence of <i>Adenophora remotiflora</i> (Campanulaceae). <i>Mitochondrial DNA Part A</i> , 27, 2963–2964	KP889213	KP889213	KP889213	KP889213	-
<i>C. baumgartenii</i> Becker		Germany, Rhineland-Palatinate, Johanniskreuz, KUN, FR-0121747	-	-	KY034455	FN396991	KY009257
<i>C. pyramidalis</i> L.		Croatia, Rijeka, Vitek 99440 (MA 641379)	EF088754	KC180808	-	-	-
<i>C. rotundifolia</i> L.		Andorra, Sáez 6134 (BCB)	HQ323846	-	KY034470	FN397034	JN571988
<i>C. versicolor</i> Andrews		Greece, Ionian Islands, Kefallínia, W. Gutermann 30067	FJ426591	KC180841	-	JX915228	KC181049.
<i>Campanula</i> subg. <i>Campanula</i>							
<i>C. cervicaria</i> L.		Germany, Baden-Württemberg, Hegau, Plören, Borsch s.n. (B), CAM037	-	KJ146646	-	FN396997	-
<i>C. collina</i> Sims		Turkey, Ag Artuin: Şauşat, Altinozlu 4228, CAM324 (HUB)	EF088711	-	-	FN397003	-
<i>C. lingulata</i> Waldst. & Kit.		Greece, Nomos Messenia, Kalamon, O Ladhas, R. & E. Willing 92.968, CAM165 (B)	-	KJ146629	-	JX914725	-
<i>C. medium</i> L.		Cultivated at Botanical Garden of Madrid, MLA0183 (MA)	EF088738	KP014571	KP014048	FN397024	EF090537, EF090578
<i>C. sibirica</i> L.		Armenia, Syunik (MA)	EF088767	KC792455	KC792359	JX914681	EF090550, EF090591
<i>C. trachelium</i> L.		Greece, Nomos Larissa, Dimos Efrimeno, Stomio, A. Schuler 480, CAM136 (B)	DQ356171	-	KY034533	FN397049	-
<i>C. tymphaea</i> Hausskn.		Greece, Nomos Ioannina, Metsovou, Willing 83481, CAM462 (B)	EF088796	KJ146649	-	JX914950	-
<i>Campanula</i> gr. <i>Trachelium</i>							
<i>C. asperuloides</i> (Boiss. & Orph.) Harms		Greece, Nomos Laconia, Elonis Monastery, G. Mansion 10043, CAM395 (B)	DQ356170	-	-	JX914915	-
<i>C. myrtifolia</i> Boiss. & Heldr.		Turkey, Ermenek-Karaman, J. Aldasoro & M. Alarcón, A9767	-	-	-	JX914773	-
<i>C. pubicalyx</i> (P.H.Davis) Damboldt		Turkey, Sarivadi, 36°34'22"N, 32°49'10"E, J. Aldasoro & M. Alarcón, A9786	EF088752	KJ910893	KJ910830	KJ910767	KM042163
<i>Trachelium caeruleum</i> L.		Spain, Santander, A3503	EF088791	-	-	-	EF090559, EF090600
<i>Diosphaera rumeliana</i> (Hampe) Bornm.		Bulgaria, Slavjanka mt., B. Kuzmanov 802845, CAM508 (B)	EF088778	-	-	JX914980	AY331464, AY322051
<i>Campanula</i> subg. <i>Roucela</i>							

<i>C. erinus</i> L.		Spain, Mallorca: Cova Negra, Sáez 6135 (BCB)	-	KC792458	-	KT753055	-
<i>C. simulans</i> Carlström		Greece, Marmaris	-	-	-	JX914680	-
<i>C. lycica</i> Kit Tan & Sorger		Greece, Kastellorizo, Crowl 38 (FLAS)	-	-	-	KT753064	-
<i>C. veneris</i> Carlström		Cyprus, Crowl 41 (FLAS)	-	-	-	JX914765	-
<i>C. pinatzii</i> Greuter & Phitos		Greece, Nomos Dodecanese, Palatia, N. Böbling 8244, CAM155 (B)	-	KC792459	-	KT753066	-
<i>C. rhodensis</i> A.DC.		Greece, Nomos Dodekanisou, Rhodos, Böbling 9695, CAM249 (B)	-	-	-	JX914781	-
<i>C. creutzburgii</i> Greuter		Greece, Crete: Dia, 35°27'8"N, 25°13'1"E, K. Alpinar (ISTE)	EF088714	KJ910848	KJ910785	KJ910724	KM042125
<i>C. drabifolia</i> Sibth. & Sm.		Greece, Laconia, Mistras, 37° 4'9"N, 22°22'17"E, (W01065)	KJ910671	KJ910857	KJ910794	KJ910732	KM042133
<i>C. dimorphantha</i> group							
<i>C. polyclada</i> Rech.f. & Schiman-Czeika		Afghanistan, Panjao, Waras, 34°14'31"N, 66°54'27"E, Rechinger 36562 (W)	EF088746	KJ910892	KJ910829	KJ910766	KM042162
<i>C. lehmanniana</i> Bunge		Afghanistan, Khost, Narai Kotal, 33°28'7"N, 69°54'4"E, Rechinger s.n. (W)	KJ910696	-	KJ910818	KJ910756	KM042156
<i>C. incanescens</i> Boiss.		Turkmenistan, Uzynsuv, Annaoy, 42°16'8"N, 58°51'39"E, J. Aldasoro, A11126	KJ910688	KJ910874	KJ910811	KJ910749	-
<i>C. cashmeriana</i> Royle		Tajikistan, Pishambe, 38°44'26"N, 69°19'11" E, J. Aldasoro, A23057	KJ910663	KJ910847	KJ910784	KJ910723	-
<i>C. dimorphantha</i> Schweinf.		Taiwan, Hualien: Hisiulin Hsiang, Chih-Chia, 24°21'24"N, 121°18'34"E, Wang 1353 (LE)	EF088708	KJ910856	KJ910793	KJ910731	-
<i>Azorina</i>-group							
<i>Azorina vidalii</i> (H. C. Watson)	1	Azores Is., Terceira, Cuatro Ribeiras, 38°47'38"N, 27°13'24"W, J. Aldasoro, A21006	EF088696	KC792460	KC792364	KC792322	AY322007, AY331420
Feer, coastal outcrops and cliffs, 0-60m	2	Azores Is., Santa María, Ponta do Castelo, 36°55'49"N, 25°0'56"W, J. Aldasoro, A21000	KJ910657	KJ910841	KJ910778	KJ910717	-
	3	Azores Is., Flores, S ^a Cruz, 39°31'15"N, 31°12'24"W, J. Aldasoro, A21026	KJ910658	KJ910842	KJ910779	KJ910718	-
<i>Campanula atlantica</i> Batt, rupicolous, calcicole, 500-1400m, (lineage <i>f</i>)		Algeria, East Tell, Guergou Gorge, 36°19'58"N, 5°03'48"E, J. Aldasoro, A19040	KJ910659	KJ910843	KJ910780	KJ910719	KM042121
<i>C. baborensis</i> Quézel (13), rupicolous, calcicole, 70-400m, (lineage <i>f</i>)		Algeria, East Tell, El Milia, 36°38'03"N, 6°16'31"E, J. Aldasoro, A19020	KJ910660	KJ910844	KJ910781	KJ910720	-
<i>C. balfourii</i> Wagner & Vierh, dry, eroded or disturbed fields and slopes, 600-1400m, (lineage <i>b</i>)	1	Yemen, Socotra, Qalansiyah, 12°39'29"N, 53°26'23"W, J. Aldasoro & A. Susanna, A16184 (M184)	KC792352	KC792472	KC792376	KC792334	KM042122
	2	Yemen, Socotra, Haggiher Mts., SE Hadibo, 12°35'30"N, 54°1'47"E, J. Aldasoro, A14643	KC792353	KC792477	KC792381	KC792335	KM042123
<i>C. bordesiana</i> Maire, oueds, disturbed sites, 1700-1900m (lineage <i>d</i>)	1	Algeria, Hoggar, Tasakent, 23°36'1.7" N, 5°58'21.5" E, J. Aldasoro, A9833	KJ910661	KJ910845	KJ910782	KJ910721	KM042124
	2	Algeria, Hoggar, Tasakent, 23°35'23.87" N, 5°58'19" E, J. Aldasoro, A9856	KJ910662	KJ910846	KJ910783	KJ910722	-

<i>C. dichotoma</i> L., eroded or disturbed fields and slopes, 100-1800m, (lineage c)	1	Italy, Sicilia, Messina, Taormina, 38°12'1"N, 15°31'57"E, J. Aldasoro, A11113	KC792349	KC792469	KC792373	KC792331	EF090527, EF090568
	2	Tunisia, El Feija National Park, Oued Chaid, 36°29'12"N, 8°22'51.2" E, P. Jiménez Mejías, 136PJM13	KJ910664	KJ910849	KJ910786	KJ910725	KM042126
	3	Algeria, East Tell, El Milia, 36°38'03"N, 6°16'31"E, J. Aldasoro, A19021	KC792350	KC792470	KC792374	KC792332	KM042127
	4	Algeria, East Tell, Ain el Hamman, 36°34'8.09"N, 4°18'31.81"E, J. Aldasoro, A19055	KJ910665	KJ910850	KJ910787	KJ910726	KM042128
	5	Algeria, East Tell, Djurjura, Lakhdaria, 36°33'45"N, 3°35'41"E, J. Aldasoro, A20087	KJ910666	KJ910851	KJ910788	KJ910727	KM042129
	6	Algeria, West Tell, Sebdoou, 34°41'25"N, 1°19'6"W, J. Aldasoro, A20050	KJ910667	KJ910852	KJ910789	KJ910728	KM042130
	7	Morocco, Béni Snassen Natural Park, 34°47'34"N, 2°24'29"W, J. Molero & S. Pike, JM171/2013 (BCN)	KJ910668	KJ910853	KJ910790	-	KM042131
	8	Morocco, Rif, Nador, 35° 7'53.99"N, 2°56'24.60"W, J. Aldasoro, A19019	KJ910670	KJ910855	KJ910792	KJ910730	-
	9	Spain, Ibiza, Cala Jondal, 38°52'3"N, 1°19'5"E, J. Aldasoro, A19018	KJ910669	KJ910854	KJ910791	KJ910729	-
	10	Morocco, Anti Atlas, Agadir, Alma Imouzer, 30°32' 40"N, 9°33' 58"W, J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A18936	KC792351	KC792471	KC792375	KC792333	KM042132
<i>C. edulis</i> Forsk., eroded or disturbed fields and slopes, 1800-2800m, (lineage d)	1	Yemen, Huarida, Manakhah, 15°03'06"N 43°44'29"E, J. Aldasoro & A. Susanna, A14514	KJ910672	KJ910858	KJ910795	KJ910733	KM042134
	2	Yemen, Halil, Samara Pass, 14°8'42"N 44°15'2"E, J. Aldasoro & A. Susanna, A14600	KJ910673	KJ910859	KJ910796	KJ910734	-
	3	Yemen, Jabel Badan, 13°58'30"N 44°15'10"E, J. Aldasoro & A. Susanna, A14591	KJ910674	KJ910860	KJ910797	KJ910735	-
	4	Yemen, Jabel Takar, 13°53'45"N 44°8'34"E, J. Aldasoro & A. Susanna, A14581	KJ910675	KJ910861	KJ910798	KJ910736	-
	5	Ethiopia, between Gara Ades and Harare, 9°16'52"N, 41°11'57"E, J. Aldasoro & M. Alarcón, A10413	KJ910676	KJ910862	KJ910799	KJ910737	-
	6	Ethiopia, Goba, Bale Mts, 6°55'57"N, 39°56'44"E, J. Aldasoro & M. Alarcón, A10386	KJ910677	KJ910863	KJ910800	KJ910738	KM042135
	7	Ethiopia, Simien, Aisa Ketana, N Debarq, 13°11'33"N, 37°53'23"E, J. Aldasoro & M. Alarcón, A9997	KJ910678	KJ910864	KJ910801	KJ910739	KM042136
<i>C. embergeri</i> Litard. & Maire, rupicolous, calcicole or silicicolous, 1600-3200m, (lineage f)	1	Morocco, High Atlas, N Tizi n' Test, 30°52'30"N, 8°21'26"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9578	KJ910679	KJ910865	KJ910802	KJ910740	KM042137
	2	Morocco, High Atlas, S Tizi n' Test, road to Taroudant, 30°51'33"N, 8°22'17"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9575 (BCN60738)	KC792347	KC792467	KC792371	KC792329	KM042138
<i>C. filicaulis</i> Durieu, disturbed or nitrified fields and slopes, 600-1900 m, (lineage e)	1	Morocco, Rif, Chefchaouen, Jebel Tissouka, 35°11'5"N, 5°12'1"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9516 (BCN60733)	KC792348	KC792468	KC792372	KC792330	KM042139
	2	Morocco, Middle Atlas, Midelt, 32°40'45.64" N, 4°43'46.16"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A17866	KJ910680	KJ910866	KJ910803	KJ910741	KM042140
	3	Morocco, Middle Atlas, Bou Iblane, 33°38'51" N, 4°8'51"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9525 (BCN60731)	KJ910681	KJ910867	KJ910804	KJ910742	KM042141
	4	Morocco, Middle Atlas, Ait-Mehammed, Tamda, 31°49'0"N, 6°23'28"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9542 (BCN60751)	KJ910682	KJ910868	KJ910805	KJ910743	KM042142
	5	Morocco, High Atlas, Tizi n' Tichka, 31°17'3.85"N, 7°22'57.42"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A11138 (BCN60747)	KJ910683	KJ910869	KJ910806	KJ910744	KM042143
	6	Morocco, High Atlas, Jebel Bou Ourioul, 31°17'59"N, 7°24'23"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9555	KJ910684	KJ910870	KJ910807	KJ910745	KM042144

	7	Morocco, Anti Atlas, Agadir Melloul, 30°26'34"N, 7°50'27"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A18961	KJ910685	KJ910871	KJ910808	KJ910746	KM042145
	8	Morocco, High Atlas, Aguelmouss, 31°16'11"N, 7°24'40"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9550	-	-	-	-	KM042146
<i>C. guinochetii</i> Quézel, rupicolous, calcicole, 2800-3100m (lineage <i>f</i>)		Morocco, Middle Atlas, Ait Bougammaz, Tizi n' Targuist, 31°44'26"N, 6°19'31"W, N. Montes, A10468	KJ910686	KJ910872	KJ910809	KJ910747	KM042147
<i>C. hypocrateriformis</i> Dobignard, eroded fields and slopes, <i>Euphorbia</i> communities, 300-1000m, (lineage <i>b</i>)	1	Morocco, Agadir, NW of Tiznit, Jebel Imzii, 29°45'7"N, 9°17'1"W, J. Aldasoro & M. Alarcón, A6911	KC792342	KC792462	KC792366	KC792324	KM042148
	2	Morocco, Agadir, Tiznit-Milka, Iguer N'Said, 29°37'33"N, 9°52'55"W, J. Aldasoro & M. Alarcón, A6967	KJ910687	KJ910873	KJ910810	KJ910748	-
<i>C. jacobaea</i> C. E. Sm. & Hook. (6) slopes, cliffs in the mountains, 20-1400 m, (lineage <i>b</i>)	1	Cape Verde Is., S. Nicolau, Tarrafal, 16°36'57" N, 24°19'47"W, J. Aldasoro & M. Alarcón, A9707	KC792357	KC792520	KC792424	KC792339	KM042149
	2	Cape Verde Is., S. Antão, Cova, 17°6'18.15"N, 25°3'30.59"W, J. Aldasoro & M. Alarcón, A9291	KC792358	KC792534	KC792438	KC792340	-
	3	Cape Verde Is., Santiago, Pico da Antonia, 15°2'56.59"N, 23°37'55.23"W, J. Aldasoro, A9510	KC792354	KC792484	KC792388	KC792336	KM042150
	4	Cape Verde Is., Fogo, Ponta Verde, 14°59'6.81"N, 24°27'27.89"W, J. Aldasoro, A9506	KC792356	KC792505	KC792409	KC792338	KM042151
	5	Cape Verde Is., Brava, Vila Nova de Sintra, 14°51'2" N, 24°42'0" W, J. Aldasoro, A9503	KC792355	KC792497	KC792401	KC792337	KM042152
<i>C. keniensis</i> , meadows, 1800-2400 m, (lineage <i>b</i>)		Kenya, NE Nanyuki, Ogdarvale Farm, 0°46'N, 41°15'E, Gilbert 4900 (National Museums of Kenya)	KJ910689		-	JX915070	-
<i>C. kremeri</i> Boiss. & Reut, eroded or disturbed fields and slopes, 200-1800 M (lineage <i>a</i>)	1	Spain, Málaga, Benahavis, S ^a Palmera, 36°35'24.00"N, 5°4'12.00"W, Fernández Casas s.n. (MA)	KJ910690	KJ910875 KJ910876	KJ910812	KJ910750	-
	2	Morocco, Rif, Chefchauen, J. Tissouka, 35°10'36"N, 5°15'57"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A10556	KJ910691	KJ910877	KJ910813	KJ910751	KM042153
	3	Morocco, Rif, Tetouan, Dardara, 35°7'17.20"N, 5°17'20"W, S. Jury & R. Shkwa 20972 (BC871418)	KJ910692	KJ910878	KJ910814	KJ910752	-
	4	Morocco, Rif, Alhoceima, Taounate, 34°47'26"N, 4°27'52"W, J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A11110	KC792344	KC792464	KC792368	KC792326	KM042154
	5	Morocco, Middle Atlas, Taza, Sidi Abdullah, 34°13'24.28"N, 4°0'21.20"W, J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A11112	KJ910693	KJ910879	KJ910815	KJ910753	KM042155
	6	Morocco, Middle Atlas, Afourer, Bin el Ouidane, 32°11'24"N, 6°30'31"W, S. Cirujano, B. Peris, A. Romo, R. Roselló & G. Sttubing 10331. (BC906875)	KC792345	KC792465	KC792369	KC792327	-
	7	Morocco, Anti Atlas, Essaouira, close to Ouled Mrabet, 31°33'16.65"N, 9°10'34.06"W, J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A23111		KJ910880	KJ910816	KJ910754	-
	8	Morocco, Anti Atlas, Chichaoua-Essauira, 31°33'18"N, 8°50'50"W, A. Hipold, AH1029, A23114	KJ910694 KJ910695	KJ910881	KJ910817	KJ910755	-
<i>C. mollis</i> L., rupicolous, calcicole, 200-2100m, (lineage <i>f</i>)	1	Spain, Almería, Gador, Berja, 36°50'43.54"N, 2°55'22.38"W, Aldasoro 6676	KJ910697	KJ910882	KJ910819	KJ910757	KM042157
	2	Spain, Granada, 37°10'38.36"N, 3°35'51.97"W, J. Aldasoro & M. Alarcón, A14211	KJ910698	KJ910883	KJ910820	KJ910758	-
	3	Spain, Cádiz, Grazalema, El Higuerón, 36°43'2.40"N, 5°29'1.36"W, J. Aldasoro & M. Alarcón, A9926	KC792346	KC792466	KC792370	KC792328	KM042158
	4	Morocco, Rif, Chefchauen, J. Tissouka, 35°10'45"N, 5°14'47"W, J.	KJ910699	KJ910884	KJ910821	KJ910759	-

		Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9512, (BCN60735)							
	5	Morocco, Saka, Ker-Gauk, Wad el Kibir, 34°33'32"N, 3°28'35"W, J. Molero (BC12797)	KJ910700	KJ910885	KJ910822	KJ910760	KM042159		
	6	Morocco, Gercif, Saka, Zawyat, Moulay Driss, Jbel Sidi al Fdil, 34°35'30"N, 3°29'40"W, J. Molero, J. M. Montserrat, J. Pallàs, J. Vicens & M. Veny, JMM 3341 (BC)	KJ910701	KJ910886	KJ910823	KJ910761	-		
	7	Algeria, Orán, S ³ Cruz, 35°42'34.34"N, 0°39'48.42"W, J. Aldasoro, A20007	KJ910702	KJ910887	KJ910824	KJ910762	KM042160		
<i>C. monodiana</i> Maire, slopes beside fumaroles, 3200-3300 m, (lineage <i>d</i>)		Chad, Tibesti Mts, Tousside, 21°2'13" N, 16°28'27"E, J. Aldasoro, A30026	KJ910703	KJ910888	KJ910825	KJ910763	-		
<i>C. numidica</i> Durieu, rupicolous, calcicole, 500-600m, (lineage <i>f</i>)		Algeria, Constantina, 36°22'27"N, 6°36'42"E, J. Aldasoro, A19027	KJ910704	KJ910889	KJ910826	KJ910764	-		
<i>C. occidentalis</i> Y.Nyman, eroded and rocky places or slopes, 100-800m, (lineage <i>a</i>)	1	Spain, Canary Is., Fuerteventura, Pájara, 28°20'55.19"N, 14°6'24.75"W, Sholtz 26011 (A18990)	KC792343	KC792463	KC792367	KC792325	KM042161		
	2	Spain, Canary Is., Lanzarote, P ^o 7 Leguas, 29°11'6.04"N, 13°27'11.03"W, J. Molero & A. Rovira 2013 (BCN)	KJ910705	KJ910890	KJ910827	KJ910765	-		
	3	Spain, Canary Is., Tenerife, Masca, 28°18'12.94"N, 16°50'28.39"W, J. Molero & A. Rovira 39/2013 (BCN)	KJ910706	KJ910891	KJ910828	-	-		
<i>C. sauvagei</i> Quézel, rupicolous, calcicole, 2100-2400m, (lineage <i>f</i>)		Morocco, High Atlas, Demnate, Ou Agga, 31°43'36.8"N, 6°58'19.75"W, N. Montes, A9701	KJ910707	KJ910894	KJ910831	KJ910768	KM042164		
<i>C. saxifragoides</i> Doumergue, rocky slopes in high mountains, 1700-3100m, (lineage <i>e</i>)	1	Morocco, High Atlas, Jebel Ayachi, 32°28'37.08"N, 4°55'17.49"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9539	KJ910708	KJ910895	KJ910832	KJ910769	KM042165		
	2	Morocco, Anti Atlas, Jebel Sahrho, 31°10'8.00"N, 5°41'23.00"W, J. Calleja, JC3059	KJ910709	KJ910896	KJ910833	KJ910770	KM042166		
<i>C. serhouchenensis</i> Dobignard, rupicolous, calcicole, 800-1900m, (lineage <i>d</i>)	1	Morocco, Middle Atlas, Col du Zad, 32°58'40.17"N, 5°7'25.68"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9531	KJ910710	KJ910897	KJ910834	KJ910771	KM042167		
	2	Morocco, Middle Atlas, Bekrit, 33°1'50"N, 5°13'43"E, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9530, JC3092 (BCN60729)	KJ910711	KJ910898	KJ910835	KJ910772	KM042168		
	3	Morocco, Middle Atlas, Bouleimane, 33°20'51"N, 4°43'14"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9526 (BCN60730)	KJ910712	KJ910899	KJ910836	KJ910773	KM042169		
<i>C. vaillantii</i> Quézel, rupicolous, calcicole, 2200-3000m, (lineage <i>f</i>)		Morocco, High Atlas, N Tizi n' Test, 30°52'24"N, 8°21'25"W, J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9579, A18971	KJ910713	KJ910900	KJ910837	KJ910774	KM042170		
<i>C. velata</i> Pomel, rupicolous, calcicole, 600-2900m, (lineage <i>f</i>)	1	Morocco, Oujda, Beni Snassen, Jebel Fouaga, 34°38'43.44"N, 1°55'20.21"W, J. Molero & J. Montserrat sn., JMM9579 (BCN)	KJ910714	KJ910901	KJ910838	KJ910775	KM042171		
	2	Morocco, Berkane, Ahfir, 34°50'36.2"N, 2°12'52.3"W, J. Molero sn. 2005 (BCN)	KJ910715	KJ910902	KJ910839	KJ910776	KM042172		
	3	Algeria, Zaouia, Ghar Rouban, 34°35'26.68"N, 1°44'28.15"W, J. Aldasoro, A10467	KJ910716	KJ910903	KJ910840	KJ910777	-		

Table S2. Habitat, life form, current distribution, time of splits and putative expansion routes of the *Azorina*-group species according to DEC analysis (Figure 3). Abbreviations: A.L.S. means Age of lineage separation from its sister lineages in (Ma), n.s. indicates not significant.

Species or lineage	Habitat	Life form	Distribution	A.L.S	Age of split between main branches (Ma) in each lineage; [ancestral area]	Origin of the lineage and direction of range expansions according to DEC-analysis in the populations tree
<i>Campanula dimorphantha</i> and Asian species (sisters: lineages <i>a-f</i> and <i>Azorina vidalii</i>)	Rupicolous, <i>C. dimorphantha</i> in disturbed fields and slopes	Annual or perennial	Asia, East Africa	11.2 (7.1-14.7)	4.4 (1.5-8.0)	Origin in Asia, later colonisation of Africa
<i>Azorina vidalii</i> (sisters: lineages <i>b-f</i>)	Coastal slopes	Perennial	Azores Islands	10.1 (6.1-13.6)	-	Putative origin in Africa and later dispersal to Azores Is.
Lineage a: <i>Campanula occidentalis</i> , <i>C. kremeri</i> (sisters: lineages <i>b-f</i>)	Disturbed fields and slopes	Annual	<i>C. occidentalis</i> : Canary Islands <i>C. kremeri</i> : Atlas and Rif ranges, South Iberian Peninsula	7.6 (4.4-11.0)	<i>C. kremeri</i> and <i>C. occidentalis</i> : 5.68 (2.8-8.69); [Middle Atlas] <i>C. kremeri</i> : 3.84 (1.61-6.26); [Rif or Middle Atlas] <i>C. kremeri</i> from the Rif and that from the Iberian Peninsula 1.32 (0.3-2.62); [Rif]	NW Africa (Rif or Middle Atlas), expansion to the south and dispersal to Canary Is. Dispersal to South Iberia from the Rif.
Lineage b: <i>C. keniensis</i> , <i>C. hypocrateriformis</i> , <i>C. balfourii</i> , <i>C. jacobaea</i> (sisters: lineages <i>c-f</i>)	Disturbed fields and slopes	Annual except <i>C. jacobaea</i>	<i>C. keniensis</i> : Ngong Hills <i>C. hypocrateriformis</i> : Tiznit, Anti Atlas <i>C. balfourii</i> : Socotra <i>C. jacobaea</i> : Cape Verde Is.	6.5 (3.4-9.6)	All species: 2.5 (0.7-4.6); [widespread] <i>C. jacobaea</i> and <i>C. balfourii</i> : 1.2 (0.5-3.4) [North Africa]	NW Africa (Anti Atlas), dispersal to Cape Verde, expansions or dispersals to Southeast (Socotra and Kenya).
Lineage c: <i>Campanula dichotoma</i> (sisters: lineages <i>d-f</i>)	Disturbed fields and slopes	Annual	Atlas, Rif, Tell, Tunisia, Sicilia, South Italy, South Iberia	4.6 (2.3-7.2)	<i>C. dichotoma</i> : 3.23 (1.29-5.44); [East Tell] <i>C. dichotoma</i> from the Rif and that from the Balearic Is. 0.38 (0.03-0.82); [Rif] <i>C. dichotoma</i> Tell plus Tunisia and that from Sicilia 0.43 (0.03-1.62); [East Tell]	NW Africa (Rif and Tell Atlas), expansion to the South and the East (Tunisia), dispersal to the Balearic Is. and Sicilia.
Lineage d: <i>C. serhouchenensis</i> , <i>C. bordesiana</i> , <i>C. monodiana</i> , <i>C. edulis</i> (sister: lineage <i>d</i>)	Eroded or disturbed fields and slopes	Perennial	<i>C. serhouchenensis</i> : Middle Atlas, <i>C. bordesiana</i> : Hoggar (Algeria) <i>C. monodiana</i> : Tibesti (Chad) <i>C. edulis</i> : Sudan, Ethiopian, Kenyan, Yemen mountains	n.s.	All species: 2.1 (0.7-3.7); [Middle Atlas] <i>C. bordesiana</i> , <i>C. monodiana</i> , and <i>C. edulis</i> : 1.0 (0.2-2.0); [Ethiopia-Yemen]	NW Africa (Middle Atlas), expansion to the Southeast (Ethiopia and Yemen), back-colonisation of the central Saharan ranges

Lineage e: <i>C. filicaulis</i> , <i>C. saxifragoides</i> (sister: lineage d)	Nitrified fields or rocky slopes in mountains	Perennial	<i>C. filicaulis</i> : Atlas, Rif <i>C. saxifragoides</i> : Atlas	n.s.	<i>C. filicaulis</i> and <i>C. saxifragoides</i> : 2.54 (1.1–4.3); [High or Middle Atlas] <i>C. filicaulis</i> : 1.9 (0.7–3.2); [High Atlas]	NW Africa (High or Middle Atlas), expansion to Anti Atlas and Rif.
Lineage f: <i>C. mollis</i> , <i>C. velata</i> , <i>C. numidica</i> , <i>C. baborensis</i> , <i>C. atlantica</i> , <i>C. vaillantii</i> , <i>C. embergerii</i> , <i>C. guinochetii</i> , <i>C. sauvagei</i> (sister: lineages d-e)	Rupicolous, generally on limestone cliffs	Perennial	<i>C. mollis</i> : Rif, Tell, South Iberia <i>C. atlantica</i> : East Tell <i>C. baborensis</i> : East Tell <i>C. embergerii</i> : High Atlas <i>C. guinochetii</i> : High and Middle Atlas <i>C. numidica</i> : East Tell <i>C. sauvagei</i> : High and Middle Atlas <i>C. vaillantii</i> : High Atlas <i>C. velata</i> : Rif, West Tell	4.1 (2.1–6.4)	All species: 3.3 (1.5–5.3); [Tell or Middle Atlas]. All species except <i>C. guinochetii</i> , <i>C. sauvagei</i> : 2.8 (1.2–4.5); [East Tell] <i>C. velata</i> from Oudja and <i>C. mollis</i> from Iberia 1.2 (0.4–2.3) [West Tell plus eastern Morocco Mts]	NW Africa (Middle Atlas, High Atlas, Rif and Tell Atlas), dispersal to Iberia.

Table S3. Corridors among refugia deduced from the DEC analysis (Figure 3).

Corridor	Species	Refugia connected and direction of expansion	Age of split of basal-most populations (Ma)	Correspondence with climate events (according to de Menocal, 2004)
1	<i>C. dichotoma</i>	East Tell and Rif [East-West]	3.2 (1.3–5.4)	Mediterranean climate onset
1	<i>C. numidica</i> - <i>C. baborensis</i> - <i>C. atlantica</i> and <i>C. mollis</i> - <i>C. velata</i>	East Tell and Rif [East-West]	2.8 (1.2–4.5)	Aridification peak 2.4–2.9 Ma
1	<i>C. kremeri</i>	Rif and the Iberian Peninsula [South-North]	1.3 (0.3–2.62)	-
1	<i>C. dichotoma</i>	Rif and Balearic Islands [South-North]	0.4 (0.1–0.8)	-
1	<i>C. mollis</i> and <i>C. velata</i>	West Tell plus eastern Morocco Mts and the Iberian Peninsula [South-North]	1.2 (0.4–3.8)	-
1	<i>C. dichotoma</i>	Tell and Sicilia [South-North]	0.4 (0.1–1.6)	-
2	<i>C. serhouchenensis</i> and <i>C. bordesiana</i> - <i>C. monodiana</i> - <i>C. edulis</i>	Middle Atlas, East Africa and Central African Mts [Northwest-Southeast]	2.1 (0.7–3.8)	Aridification peak 2.4–2.9 Ma
2	<i>C. keniensis</i> and <i>C. hypocrateriformis</i>	E Africa and Anti Atlas [unknown direction, likely extinction and vicariance]	2.5 (0.5–3.43)	Aridification peak 2.4–2.9 Ma
2	<i>C. jacobaea</i> and <i>C. balfourii</i>	Socotra and Cape Verde [unknown direction, likely extinction and vicariance]	1.2 (0.5–3.4)	Aridification peak 1.6–1.8 Ma

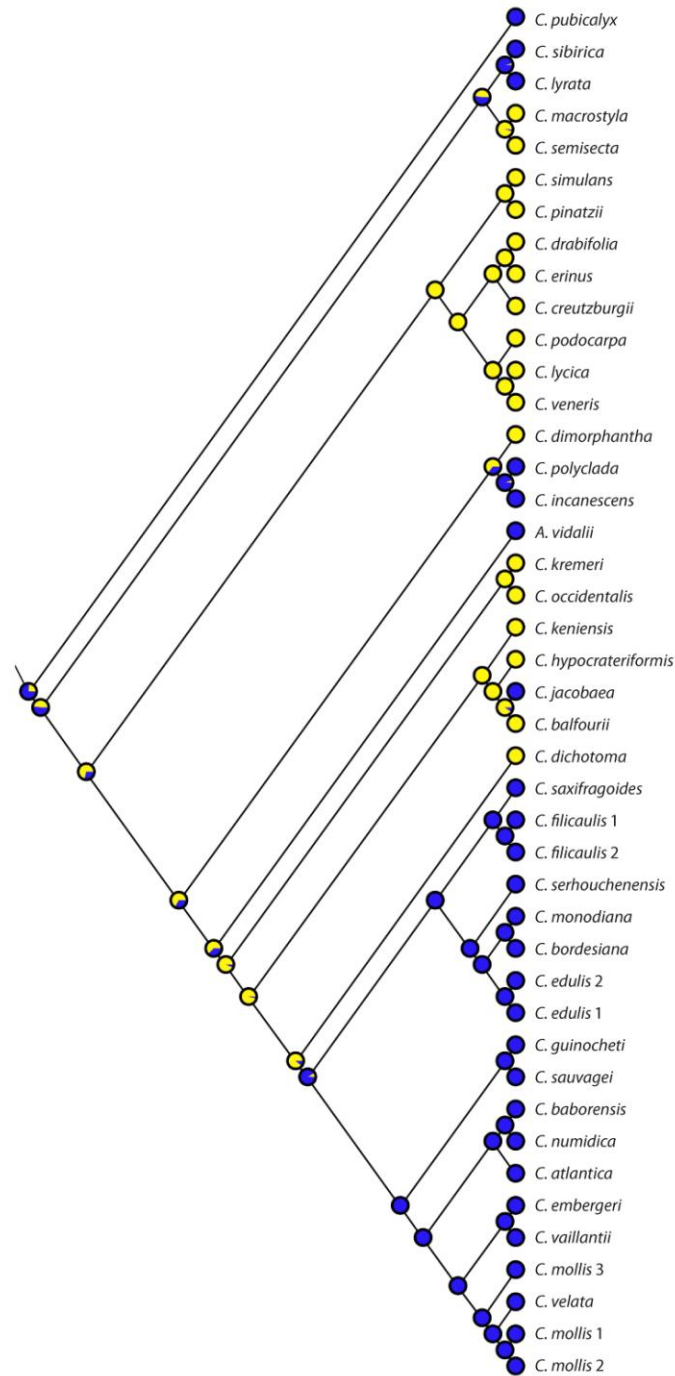


Figure S1. Optimization of the evolution of life form using the maximum likelihood method in Mesquite v. 2.0 for the pruned phylogenetic tree of the *Azorina*-group and outgroup. Life form: blue, perennial; yellow, annual.

CAPÍTOL 4

**North-west Africa as a source and refuge
area of plant biodiversity: a case study on
Campanula kremeri and *Campanula occidentalis***

Abstract

North-west Africa, because of its position at the crossroads between Macaronesia and the Iberian Peninsula, has played an important role on the emergence and maintenance of Mediterranean plant diversity. In this study, we reconstruct the phylogeographical history of a lineage of bellflowers comprising the north African-south Iberian species *Campanula kremeri* and the Canarian *Campanula occidentalis* (*Azorina*-group), to investigate the genetic imprints left by past climatic and palaeogeographical events on the northern African flora.

We reconstructed the biogeographical history of the *Azorina*-group to provide a phylogenetic background. We then investigated the phylogeographical patterns within *C. kremeri* and *C. occidentalis* using the AFLP and sequence data. We integrated these results with the past species-distribution modelling to understand the current biodiversity patterns within this lineage.

The ancestor of *C. kremeri*-*C. occidentalis* diverged in the Late Miocene/Early Pliocene. Nuclear data supported species monophyly, whereas plastid data suggested that *C. kremeri* is paraphyletic. Maghrebian populations of *C. kremeri* showed high genetic diversity, whilst Iberian ones and those of *C. occidentalis* exhibited lower values.

Repeated expansion-retraction events associated with Pleistocene climatic changes in North Africa facilitated gene flow across Maghrebian ranges in *C. kremeri*. Mountain massifs in north-west Africa likely acted as refugia for Mediterranean plants during interglacial periods, whereas range expansion in cooler periods triggered dispersal to neighbouring regions. The range of *C. kremeri* expanded to the Iberian Peninsula by long-distance dispersal across the Strait of Gibraltar during the Pleistocene. The relatively old age inferred for *C. occidentalis* together with its low genetic diversity point to a recent colonization of the Canary Islands from north-west Africa followed by extinction in the mainland or an old lineage that underwent a recent genetic bottleneck.

1. Introduction

The Mediterranean region has long been recognized as a plant biodiversity hotspot with a complex evolutionary history (Myers & Haines, 2000). Though several recent studies have focussed recently on the evolution of plants from the Mediterranean islands and the southern European peninsulas (Médail & Diadema, 2009; Molina-Venegas *et al.*, 2013), studies on northern African lineages are much scarcer in comparison, and this flora has been little explored to date. This is particularly striking because the northern African flora is very diverse, comprising both narrow endemics and widespread taxa, and a high proportion of annual and autogamous taxa. The latter is probably a consequence of longlasting disturbance regimes, drought events, and climatic fluctuations in the last three million years (Lavergne *et al.*, 2013).

The few studies focussing on northern African plant diversity support the north-west African region as a refuge and a cradle of genetic diversity (e.g. Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2008; Désamoré *et al.*, 2011). The heterogeneous relief of the Maghreb region, combined with climatic stability in certain areas, have favoured a high degree of genetic distinctiveness and diversity (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2008; Husemann *et al.*, 2014). For example, the Baetic-Riffian ranges account for up to 18% of the plant species richness in the Mediterranean Basin (Molina-Venegas *et al.*, 2013). Some studies focussing on annual plants (Ortiz *et al.*, 2009; Valtueña *et al.*, 2016) have found a phylogeographical pattern in which the genetic structure and diversity peak in the northern Maghreb followed by a gradient of decreasing diversity towards southern Europe; others (Fernández-Mazuecos & Vargas, 2011; García-Verdugo *et al.*, 2015) show genetic diversity centres in southern Europe and Macaronesia (Table S1). North-west Africa has been intermittently connected to Southwest Europe through the Strait of Gibraltar. At the end of the Miocene, the Messinian Salinity Crisis (c. 5.9 Ma; Duggen *et al.*, 2003) allowed biotic exchange between Europe and Africa across this strait (Fiz-Palacios & Valcárcel, 2013). The Strait of Gibraltar was re-flooded during the Zanclean (3.60–5.33 Ma), but during Pleistocene glacial cycles (0.10–2.6 Ma) sea-level fluctuations (Bintanja *et al.*, 2005) likely favoured connections between Africa and

Europe through reduced geographical distances. Thanks to their colonization abilities, annual plant species are the best candidates to have repeatedly dispersed between South Europe and North Africa (Lavergne *et al.*, 2013). Given this long-history of connection and disconnection events across the Strait, one would expect to see it reflected in multiple waves of colonization and retraction.

In addition to this connection with Southwest Europe, the north-west African flora shows important affinities with the Macaronesian flora. The north-west African mainland has been likely the source of colonization events in many Macaronesian lineages (Sanmartín *et al.*, 2010). Macaronesia has also probably played a role as a refuge during dry periods; consequently patterns of both regions are often interconnected (Mairal *et al.*, 2015).

Here, we reconstruct phylogeographical patterns within a lineage of bellflowers (*Campanula*, Campanulaceae), the sister-group formed by the western Atlanto-Mediterranean species *Campanula kremeri* Boiss. & Reut. and *Campanula occidentalis* Y. Nyman, to investigate phylogeographical connections amongst the Maghreb region, the Iberian Peninsula and Macaronesia. To provide a phylogenetic background for this lineage, we first reconstruct phylogenetic relationships and the biogeographical history of the more inclusive *Azorina*-group (Alarcón *et al.*, 2013), a lineage of *Campanula* that includes c. 23 species, most of them distributed in North Africa and including *C. kremeri*-*C. occidentalis*. We then use DNA sequences, amplified fragment length polymorphism (AFLP), and species-distribution modelling to reconstruct phylogeographical patterns in two annual sister-species: *C. kremeri*, endemic to southern Iberian Peninsula and north-west Africa, and *C. occidentalis*, occurring in the Canary Islands. Our aims are to: (1) Infer the imprints left by past climatic and palaeogeographical events on the genetic structure of *C. kremeri*-*C. occidentalis* as a case study of the north-western African flora. (2) Detect geographical barriers, colonization events and potential refugia that shaped the current genetic diversity patterns in this lineage. (3) Examine whether the Strait of Gibraltar acted as an effective geographical barrier to gene flow for *C. kremeri*, with special attention to possible waves of colonization across this strait.

2. Materials and Methods

2.1. Study group and sampling

To clarify the phylogenetic relationships within the *Azorina*-group, 29 species were included in the dataset: 23 species of the *Azorina*-group, plus three Asian relatives (*C. cashmeriana*, *C. dimorphantha*, *C. lehmanniana*), two species of the subgenus *Roucela* (*C. creutzburgii* and *C. drabifolia*), and *C. sibirica*, which were used as outgroups according to Olesen *et al.* (2012).

To investigate the phylogeographical patterns in *C. kremeri* and *C. occidentalis*, we sampled 16 populations (134 individuals in total), spanning the geographical range of each species: for *C. kremeri*, we sampled three populations in the Iberian Peninsula and eight in the Maghreb region (three in the Rif and five in the Atlas); for *C. occidentalis*, one population in Lanzarote, one in Fuerteventura and three in Tenerife (Tables 1 & S2).

2.2. DNA sequencing

Total DNA was extracted from silica gel-dried plant tissue using the 'DNeasy Plant Mini Kit' (QIAGEN Inc., California, USA) according to the manufacturer's instructions. To reconstruct phylogenetic relationships within the *Azorina*-group, four highly variable cpDNA regions were sequenced: *petB-petD* (885 bp), *rpl32-trnL* (484 bp), *trnS-trnG* (737 bp) and *trnL-trnF* (892 bp). We also sequenced ITS (579 bp) and the low-copy-nuclear gene PPR11 (639 bp). The phylogeographical history of *C. kremeri*-*C. occidentalis* was reconstructed with the same markers, employing one individual per population. Finally, a within-population study was performed in this lineage using only plastid haplotypes; for this, we chose the two most variable regions, *rpl32-trnL* and *trnS-trnG*, generating 134 sequences for each marker. In total, we generated 392 cpDNA and 91 nrDNA sequences. Sources of material, location of vouchers, amplification parameters, GenBank accessions and full references are detailed in Tables S2 & S3.

2.3. Phylogenetic and biogeographical analyses in the *Azorina*-group

Sequences were aligned with Mafft (Kato *et al.*, 2005) and checked by eye. The software jModeltest v. 2.2 (Posada, 2008) was used to determine the best-fitting model of sequence evolution using the Akaike information criteria (AIC): GTR + Γ for the plastid dataset and GTR for ITS and PPR11. Phylogenetic analyses were performed on separate and concatenated matrices of the four plastid and two nuclear regions. Divergence times between lineages were estimated with BEAST v. 1.7.5 (Drummond & Rambaut, 2007) using a relaxed clock method with uncorrelated rates drawn from a lognormal distribution; a calibration time of 21 Ma was assigned to the split between *Campanula sibirica* and the *Azorina*-group (root-node), based on Olesen *et al.* (2012), and using a normal-distributed prior (mean = 21 Ma; Standard Deviation = 2). The plastid dataset and the nuclear markers (ITS and PPR11) were treated as three separate partitions, with the substitution and clock models unlinked. A birth-death prior was used as the speciation model, with four runs of 5×10^7 generations each, sampling every 1000th generation. Resulting posterior distributions for parameter estimates were checked in Tracer 1.4.1 (Drummond & Rambaut, 2007) and maximum credibility (MCC) trees were calculated after removing a burn-in of 20% with Tree Annotator 1.6 (Drummond & Rambaut, 2007). The MCC tree inferred from Beast was used as input to reconstruct the spatio-temporal evolution of the group, using the R package 'BioGeoBEARS' (Matzke, 2014): eight distribution areas (Azores Islands; Asia and Balkans; Canary Islands; Cape Verde Islands; Central Africa; East Africa, Arabia and Socotra; Iberian and Italian Peninsulas, Sicily and Balearic Islands; north-west Africa) were defined; all available models in BioGeoBEARS were fitted and compared based on AIC; final biogeographical reconstruction was performed with the model that yielded the lowest AIC (DEC+J).

2.4. Phylogenetic study of *C. kremeri*-*C. occidentalis* lineage

Phylogenetic relationships within the *C. kremeri*-*C. occidentalis* lineage were reconstructed with nuclear and plastid markers. As the nuclear and plastid

markers were incongruent for this clade (ILD test, Farris *et al.*, 1995, P-value < 0.05; ITS was congruent with PPR11, P = 0.49), we performed independent BEAST analyses for the plastid and nuclear datasets sampling one individual per population of *C. kremeri* and *C. occidentalis* (11 and 5 populations, respectively). Parameters employed were the same as in the *Azorina*-group Beast analysis, but we used a calibration time of 13 Ma (SD = 1.5) assigned to the split between *Campanula dimorphantha* and the *Azorina*-group (the root-node in this analysis). Some species of *Campanula* can hybridize (Nyman, 1991) and we obtained different topologies from the nuclear and the plastid datasets. We consequently built a rooted phylogenetic network using Dendroscope 3 (Huson & Scornavacca, 2012) to search for hybridization events. We used two sets of 1000 trees randomly sampled from the Beast analyses of the nrDNA and cpDNA datasets and computed a level-k network, minimizing the number of reticulations in any biconnected component of the network. Reticulations were limited to the branches present in 95% of the trees of each dataset, i.e., 47.5% threshold. Additionally, we used *Beast (Heled & Drummond, 2010) and a similar approach to Blanco-Pastor *et al.* (2012) to explore the incongruence found between cpDNA and nrDNA phylogenies. We constructed a multilabelled species tree to retrieve the origin of the ancestral lineages of clades affected by the reticulation processes; this multilabelled tree was assembled by assigning assumed sequences from the putative hybrids to separate labels: the nuclear sequences to one label (N), and the plastid ones to the other (P). Hence, two labels of a potential hybrid (N and P) were treated as different species in the *Beast analysis; this ensured that putative reticulations were analysed without violating the assumptions of the multispecies coalescent *Beast model. Four Markov chain Monte Carlo (MCMC) analyses were run for 108 generations, sampling every 1000th generation, using the same settings as above, and with *C. dimorphantha* and *Azorina vidalii* as outgroups. A Densitree plot (Bouckaert, 2010) was used to summarize all possible topologies.

Table 1. Descriptors of within-population genetic diversity in plastid haplotypes and AFLPs for each *C. kremeri* and *C. occidentalis* population. Abbreviations refer to: the number of samples (n), haplotype diversity [H (d)], nucleotide diversity (p), nucleotide heterozygosity (h), the number of polymorphical fragments (PF), percentage of polymorphical fragments (%PF), Nei's gene diversity and standard error [Hj (se)] and the number of private fragments (Np).

Locality, population and code	Plastid haplotypes					AFLPs					
	n	Haplotypes	H (d)	π	θ	n	PF	% PF	Hj (se)	Np	
Iberia, Istán	IP1	10	H8	0	0	0	11	362	45.5	0.1470 (0.006)	1
Iberia, Benarrabá	IP2	12	H7, H8	0,167	0,00012	0,00023	11	236	29.6	0.1130 (0.005)	0
Iberia, S. Pedro	IP3	12	H8	0	0	0	11	356	44.7	0.1385 (0.006)	0
<i>C. kremeri</i> Iberia		34		0,451	0,00032	0,00017	33	281	35.3	0.1275	
W Rif, J. Tissouka	WR1	5	H9, H10	0.400	0.00028	0.00034	11	466	58.5	0.1859 (0.006)	1
W Rif, Talassemtane	WR2	10	H8	0	0	0	10	352	44.2	0.1582 (0.006)	4
<i>C. kremeri</i> W Rif		15		0.514	0,00043	0,00043	21	458	57.5	0.1867	
E Rif, Al Hoceima	ER1	4	H1	0	0	0	7	426	53.5	0.2029 (0.006)	12
M. Atlas, Taza	AT1	5	H1, H2	0.600	0.00049	0.00039	6	387	48.6	0.1912 (0.006)	5
C. Morocco, Mulay Idris	AT2	3	H3, H6	0.667	0.00109	0.00109	3	213	26.8	0.1116 (0.006)	3
H. Atlas, Afourer	AT3	7	H3, H5, H6	0.667	0.00102	0.00102	3	282	35.4	0.1838 (0.007)	0
A. Atlas, Chichaoua	AT4	7	H3, H4	0.286	0.00023	0.00033	7	341	42.8	0.1625 (0.006)	4
A. Atlas, Oued Mrabet	AT5	9	H3	0	0	0	9	350	44.0	0.1479 (0.006)	7
<i>C. kremeri</i> E Rif+Atlas		35		0.640	0.00283	0.00239	35	464	58.3	0.1959	
Lanzarote, Siete Leguas	CI1	10	H11	0	0	0	10	291	36.6	0.0921 (0.005)	0
Fuerteventura, Pájara	CI2	11	H11	0	0	0	12	230	28.9	0.0979 (0.005)	1
Tenerife, Anaga	CI3	9	H11	0	0	0	10	294	36.9	0.0959 (0.005)	0
Tenerife, Guimar	CI4	10	H11	0	0	0	10	328	41.2	0.1107 (0.005)	1
Tenerife, Masca	CI5	10	H11	0	0	0	10	322	40.5	0.1161 (0.005)	0
<i>C. occidentalis</i> Canary Is.		50		0	0	0	52	270	33.9	0.0996	

2.5. *Haplotype and DPA analyses*

The evolutionary history of the *C. kremeri*-*C. occidentalis* lineage was further investigated using a concatenated haplotype dataset including only the regions *rpl32-trnL* and *trnS-trnG* sequenced for all individuals of these two species. Haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (p), Tajima D, Fu's Fs and other genetic parameters were calculated with Dnasp v. 5.1 (Librado & Rozas, 2009) without considering gaps (Tables 1 & S4). Relationships amongst plastid haplotypes were inferred in TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000) with gaps as missing data. The Bayesian discrete phylogeographical analysis (DPA) of Lemey *et al.* (2009), implemented in BEAST, was used to trace the history of migration events. DPA uses a continuous-time Markov Chain process, in which the discrete states correspond to geographical locations of sequences and transition rates between states to migration rates between areas (Mairal *et al.*, 2015). Three areas were defined (Iberian Peninsula, North Africa and Canary Islands), with between-areas migration rates and the geodispersal rate scaler modelled using default gamma-prior distributions. We used the BSSVS method and Spread v. 1.0.6 (Bielejec *et al.*, 2011) to identify the most likely diffusion routes. Bayes factors comparisons (BFs) with a cutoff value of 3 were used, and results visualized into a KML file. For the two nuclear markers, we inferred median networks using Network v. 4.2.0.143 (Bandelt *et al.*, 1999), employing the same individuals as in the previous phylogenetic analyses.

2.6. *AFLP genotyping and analyses*

To explore the population genetic structure raised by the nuclear compartment, we carried out AFLP genotyping analyses (Vos *et al.*, 1995). We used the AFLP Plant Mapping Kit (Applied Biosystems); genomic DNA was digested with the enzymes *EcoRI* and *MseI* and linked to adaptors. Thirtytwo combinations of selective primers were tested, and four were retained that showed clear and evenly distributed bands and polymorphical profiles: 1- *EcoRI*_{6-FAM}-ACC/*MseI*-CCT; 2- *EcoRI*_{6-FAM}-ACT/*MseI*-CAC; 3- *EcoRI*_{VIC}-AGG/*MseI*-CAA, and 4- *EcoRI*_{VIC}-

AGG/MseI-CAC. For each sample, 0.3 μ L of 6-FAM-labelled and VIC-labelled selective PCR products were combined with 0.5 μ L of GeneScan 500 LIZ and 13.5 μ L of formamide. Fragment electrophoresis was conducted at PCM (Spain) using ABI 3730 capillary sequencer.

Amplified fragments were analysed using Genemapper v. 3.7 (Applied Biosystems), and peaks ranging between 100 and 500 base pairs were recorded. We estimated error rates with AFLP Scorer (Whitlock *et al.*, 2008), and fixed them to 5% for each primer combination. A total of 796 fragments were scored. Data reliability was assessed by comparing duplicates (26 tests). The reproducibility obtained was 91–100%, with a mean of 95.8%. Based on the AFLP presence/absence matrix, the number of private fragments per population or group of populations was recorded (Table 1).

We estimated Nei's gene diversity (H_j), F_{ST} , the percentage of polymorphical fragments per individual (P) (Nei & Li, 1979) with Aflpsurv 1.0 (Vekemans, 2002), assuming partial self-fertilisation and Hardy-Weinberg equilibrium. We estimated allelic frequencies with a Bayesian method, employing non-uniform prior distribution. We calculated F_{ST} with 10,000 permutations. Neighbour-nets were inferred using Splitstree v. 4.10 (Huson & Bryant, 2006). We quantified the amount of genetic differentiation of population groups using a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) using Arlequin v. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005; see Table S5).

We assessed the structure of populations with Structure v. 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000), assuming admixture and uncorrelated allele frequencies between groups. We ran 500,000 generations (burn-in of 100,000), for K values from one to six, with ten repetitions, considering only those runs with the highest likelihoods values and we used the LnP (D) measure for the successive decomposition of groups (Evanno *et al.*, 2005). BARRIER 2.2 (Manni & Guérard, 2004) was used to identify possible geographical locations acting as major genetic barriers; significance was tested with 1000 bootstrapped distance matrices. To test the effect of the spatial distance in the genetic structure found in the AFLP analysis, we

used the Mantel test (Ntsys 2.1; Rohlf, 1998) to correlate the genetic (as F_{ST}) and spatial distances within the main lineages derived from our results.

2.7. Species-distribution modelling

Species-distribution modelling was performed to infer the potential distributions of *Campanula kremeri* and *C. occidentalis*, under present climatic conditions and late Quaternary conditions (Last Interglacial period LIG, and Last Glacial Maximum LGM). The occurrence datasets comprised 29 localities for *C. kremeri* and 15 localities for *C. occidentalis* (Table S6). We employed the maximum entropy algorithm as implemented in Maxent 3.3 (Phillips *et al.*, 2006). We retrieved 19 bioclimatic variables from the WorldClim website (Hijmans *et al.*, 2005) which were clipped to cover the Iberian Peninsula, Maghreb and the Canary Islands. Highly correlated variables ($r > 0.7$) were reduced to seven uncorrelated variables used as predictors to calibrate the distribution models in Maxent. To test model predictive performance, we split localities into training (75%) and test data (25%), with ten subsample replicates. The distribution model under current conditions was projected to two time slices of the late Quaternary: the LIG (c. 80 ka), model of Otto-Bliesner *et al.* (2006), and the LGM (c. 21 ka) under two models: the Community Climate System Model (CCSM; Collins *et al.*, 2006) and the Model for Interdisciplinary Research on Climate (MIROC; Hasumi & Emori, 2004).

3. Results

3.1. Dated phylogeny and biogeography of the Azorina-group

The combined plastid-nuclear dataset resulted in a sequence alignment of 4436 bp (*petB-petD*, *rpl32-trnL*, *trnS-trnG*, *trnL-trnF*, ITS, and PPR11). Six Asian species were reconstructed as outgroups to the *Azorina*-group, formed by *Azorina vidalii* and two major subclades: clade I formed by *C. kremeri* and *C. occidentalis*; and clade II containing the remaining species (Figs 1, S1, S2). The split between *A. vidalii* and the ancestor of clades I and II was estimated at 8.2 Ma (95%HPD 7.52–

12.46), whilst the divergence time of clades I and II was dated at 6.9 Ma (95%HPD 4.96–9.51). The biogeographical reconstruction with the DEC+J model supported an ancestral Asian *Campanula* that dispersed towards Africa (Fig. 1). For the ancestor of clades I and II, the reconstruction with the highest probability corresponds to north-west Africa, followed by the colonization by several lineages of Macaronesia, Arabia and the southern European Peninsulas (Fig. 1). The most recent common-ancestor of clade I (*C. kremeri* and *C. occidentalis*) was distributed in north-west Africa (Fig. 1), further diverging into three main lineages divided by their geographical distribution: (1) Canary Islands; (2) eastern Rif and Atlas; and (3) western Rif and Iberian Peninsula (Fig. 2A).

3.2. *Phylogenetic study of the lineage C. kremeri-C. occidentalis*

The phylogenetic analyses with an extended population sampling within *C. kremeri-C. occidentalis* group depicted significant incongruence amongst the plastid and the nuclear compartments. According to the nuclear dataset, this lineage split into two clades that match the delimitation of the two species (PP > 0.99; Figs 2A & S1). In contrast, the plastid dataset led to a different topology, showing *C. kremeri* as paraphyletic, with *C. occidentalis* nested within (PP > 0.99; Figs. 2A, B). The Dendroscope k-level phylogenetic network showed one significant reticulation event within *C. kremeri* (Fig. 2B), between the lineage comprising Atlas populations and the lineage leading to the western Rif populations. The multilabelled *BEAST analysis, with plastid and nuclear sequences from the Atlas labelled as different lineages, resulted in a tree topology in which all posterior probabilities were higher than 0.95 (Fig. 2C). All possible topologies as recovered by the Densitree plot (Fig. S3) suggested this same reticulation event.

3.3. *Phylogeographical patterns in C. kremeri and C. occidentalis*

The plastid haplotype network analysis (Figs. 3A, B) showed differences in 40 nucleotide positions. We detected 11 haplotypes, ten within *C. kremeri* and one

in *C. occidentalis*. Haplotypes 1–2 were exclusive of populations ER1 and AT1; haplotypes 3–6 were found only in AT2–5. Haplotype 3 had the highest number of connections. Haplotype 7 was exclusive to IP2, whilst haplotype 8 was shared by all populations in the Iberian Peninsula and the western Rif (WR2). Haplotypes 9–10 were exclusive to the western Rif. Haplotype 11 was the only one found in the Canary Islands. Our data rendered a H_d considerably higher in North Africa than in the Iberian Peninsula and the Canary Islands (Tables 1 & S4). For some populations (e.g. AT2 & ER1; Table 1), we could not obtain sequences for all sampled individuals. This unevenness in the molecular data might have reduced the power to detect intra-population variability within those populations. Nevertheless, the results from DNA sequencing were consistent with those from the AFLP analysis.

The DPA analysis based on *rpl32-trnL* and *trnS-trnG* (Fig. 3A inside the square) showed a first divergence event, corresponding to the separation between two clades: (1) all accessions from the eastern Rif and the Atlas ($PP = 1$); and (2) with a lower support ($PP = 0.88$), the accessions from the Canary Islands, Iberian Peninsula, and western Rif. Three migration routes were supported by the BF test: one colonization event from North Africa to the Iberian Peninsula, one possible re-colonization from the Iberian Peninsula to Africa, and one dispersal event from continental Africa to the Canary Islands (Fig. 3A). In contrast, the nuclear network showed a central network formed by the eastern Rif, the Atlas and the western Rif, with two long branches: one connecting with the Iberian haplotype, and a second connecting the two Canarian haplotypes (Fig. 3C).

For the AFLP analysis, estimates of the Nei's gene diversity (H_j), the percentage of polymorphical fragments (%PF), and the number of private fragments (N_p) were high in populations of eastern Rif and Atlas, and considerably lower in the Iberian Peninsula and Canary Islands (Table 1). Structure indicated that the number of optimal groups was $K = 3$ (Fig. S4), clustering the populations into three groups: (1) Canary Islands; (2) Atlas and eastern Rif; and (3) western Rif and Iberian Peninsula (Fig. 4). These groups were highly congruent with the Barrier analysis, revealing two major boundaries separating the same groups. The

results for $K = 4$ and $K = 5$ were very similar (Fig. S5), though the Atlas cluster is further divided into two clusters. F_{ST} values were consistent with the results obtained with the chloroplast-only dataset, showing the same genetic cohesions between populations. The Mantel test showed a significant correlation between genetic and geographical distance only for the Baetic-western Rif ($r = 0.734$, $**p = 0.002$) and the Atlas-eastern Rif areas ($r = 0.577$, $**p = 0.018$), but not for *C. occidentalis* ($r = 0.018$, $p = 0.46$). Hierarchical AMOVA showed the largest proportion of genetic variation for groups 3 and 5 (Table S5); the 3-group results were consistent with those of Structure (Fig. 4).

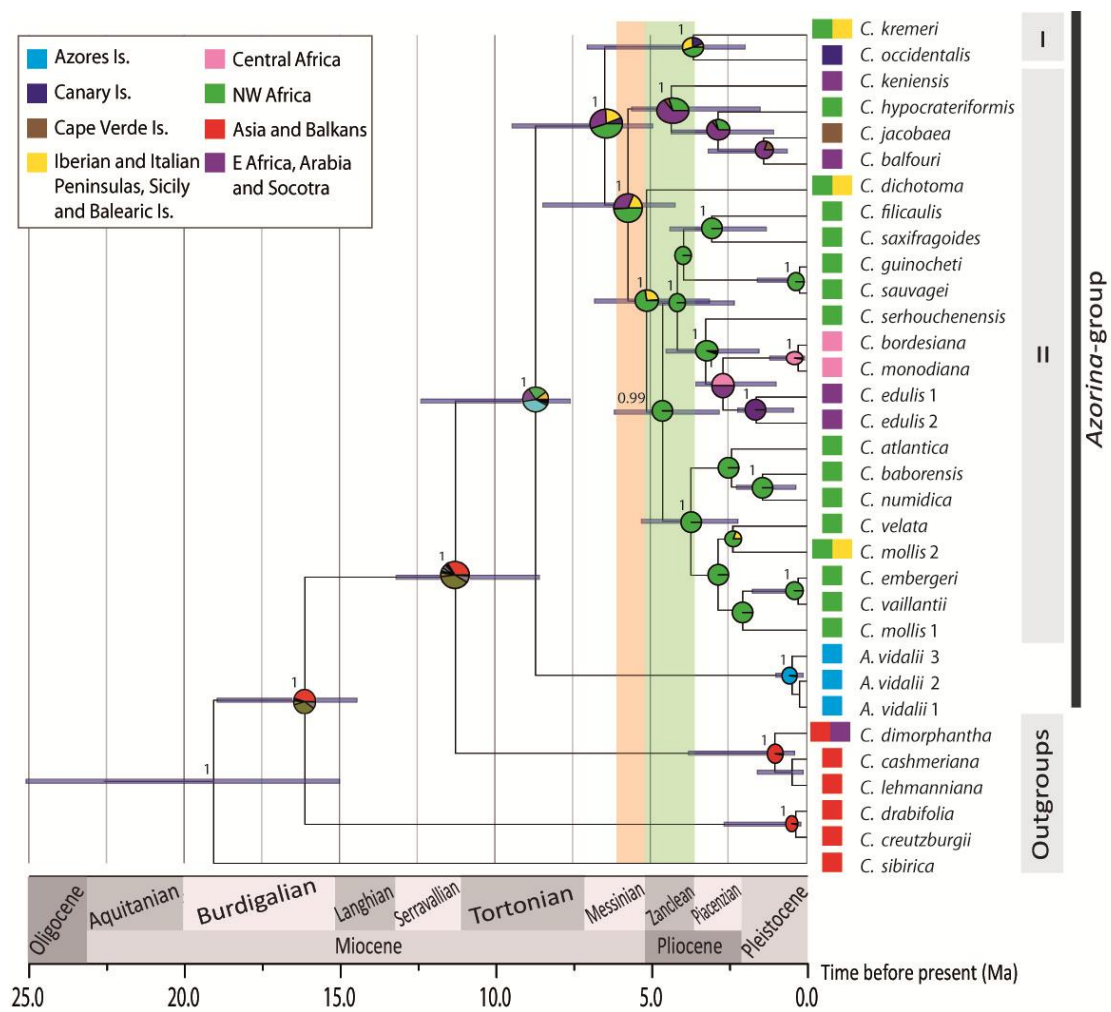


Figure 1. Maximum-clade-credibility (MCC) time-calibrated tree of *Azorina*-group of species inferred and dated with a Bayesian analysis implemented in BEAST. Numbers above branches indicate the posterior probabilities and blue bars represent the posterior distribution of divergence-time estimates. Biogeographical reconstruction was inferred with the DEC+J model as implemented in BioGeoBEARS. Squares to the left of taxon names indicate distribution areas (see legend). Pink and green stripes show the periods of Messinian Salinity Crisis and the refilling of the Mediterranean respectively.

The Neighbour-net diagram obtained from the AFLP data (Fig. 4) was in line with the results of the median network based on nuclear DNA sequences (Fig. 3C): five major clusters, with Iberian and Canarian samples sorted into more differentiated groups, whilst north-west African populations showed considerable admixture amongst them. Rif populations that carry the nuclear compartment) and ‘*C. kremeri* (AT+ER) P’ (progenitor lineage of Atlas and eastern Rif populations that carry the plastidial compartment).

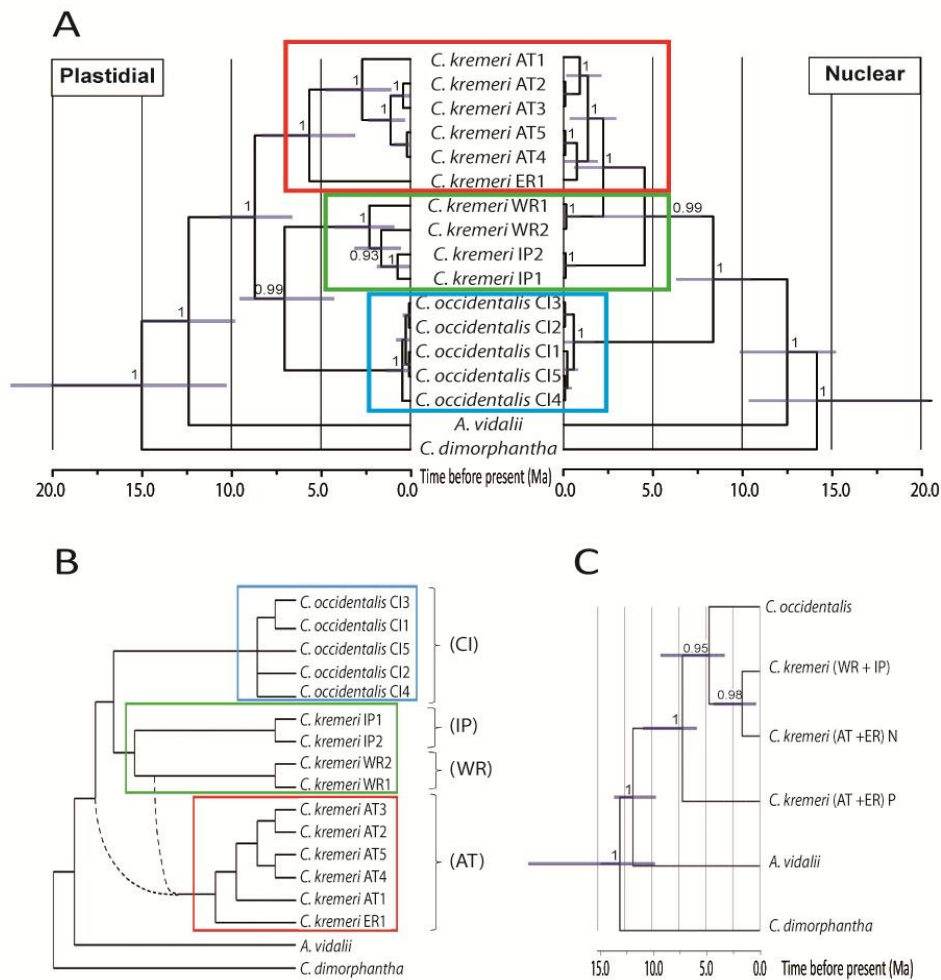


Figure 2. (A) MCC time-calibrated tree of *C. kremeri*-*C. occidentalis* populations based on plastid and nuclear markers and obtained with Bayesian analysis implemented in BEAST. Plastid markers are *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *petB-petD* and *rpl32-trnL*; nuclear markers are ITS and PPR11. Numbers above branches indicate the posterior probabilities and blue bars represent the posterior distribution of divergence-time estimates. The squares represent the three main lineages: red, Atlas and eastern Rif; green, western Rif and Iberian Peninsula; and blue, Canary Islands. Areas are coded: IP- Iberian Peninsula; WR- Western Rif; ER- Eastern Rif; AT- Atlas; and CI-Canary Islands. Rooted hybridization networks generated from the MCC trees of the plastid and nuclear data implemented in Beast: (B) network built using the level-k 47.5 algorithm implemented in Dendroscope 3.

The squares represent the three main lineages as in Fig. 2A; and (C) multilabelled MCC tree obtained in the *BEAST species tree analysis. Lineages inferred to be of hybrid origin are labelled 'C. kremeri (AT+ER) ER) N' (progenitor lineage of Atlas and eastern Rif populations that carry the nuclear compartment) and 'C. kremeri (AT+ER) P' (progenitor lineage of Atlas and eastern Rif populations that carry the plastidial compartment).

3.4. *Species-distribution modelling*

Campanula kremeri is distributed in wet-eroded sites at the foothills of western Maghrebian and southern Iberian ranges, whilst *C. occidentalis* grows in rather similar habitats in the Canaries. The first species is abundant in the Rif and Middle Atlas and infrequent in the High Atlas (Table S6). We obtained distribution models with high predictive accuracy for both the species according to the area under the curve (AUC = 0.952 ± 0.051 and 0.994 ± 0.003 , respectively). The main predictor variable for *C. kremeri* was the precipitation of the wettest quarter (Bio16), whereas for *C. occidentalis*, it was the temperature annual range (Bio7). The predicted current distribution of both species was consistent with their known distribution range (Fig. S6) and similar to the potential distribution during the LIG. In contrast, the LGM projections (CCSM and MIROC, Fig. S6) revealed a larger potential distribution of both species.

4. Discussion

4.1. *North-west Africa as a hub of diversification in Mediterranean plants*

According to our results, the *Azorina*-group within *Campanula* originated from an ancestor that dispersed from West Asia to North Africa in the Late Miocene (c. 8.7–13.3 Ma) which agrees with previous studies (Roquet *et al.*, 2009; Alarcón *et al.*, 2013). Therefore, Afro-Macaronesian bellflowers would have needed to adapt to the incipient aridification of North Africa during this period (Zhang *et al.*, 2014), which might have been possible thanks to a combination of physiological and morphological features, such as autogamous or facultative reproductive systems, short lifespan, easily dispersible seeds, and the ability to cope with a variety of disturbed habitats and substrates. Importantly, biogeographical analyses suggest that the most basal divergence events within the

Azorina-group involved north-west Africa as the ancestral area, and date back to the Late Miocene-Pliocene. From this area, several dispersal events to nearby adjacent regions (Central Africa; Eastern Africa, Arabia and Socotra; Macaronesia; and southern European Peninsulas; Fig. 1) took place. This role of north-west Africa as a source area of dispersal events and a ‘hub of diversification’ for Western Mediterranean plants mirrors the pattern found in animals (Husemann *et al.*, 2014) and plants (Valtueña *et al.*, 2016). One explanation for this role is the high topographical complexity, with the Atlas and Rif mountain ranges allowing genetic isolation amongst populations and allopatry. Another is range-shifts during Pleistocene glacial cycles, which would have favoured both secondary contacts and subsequent isolation.

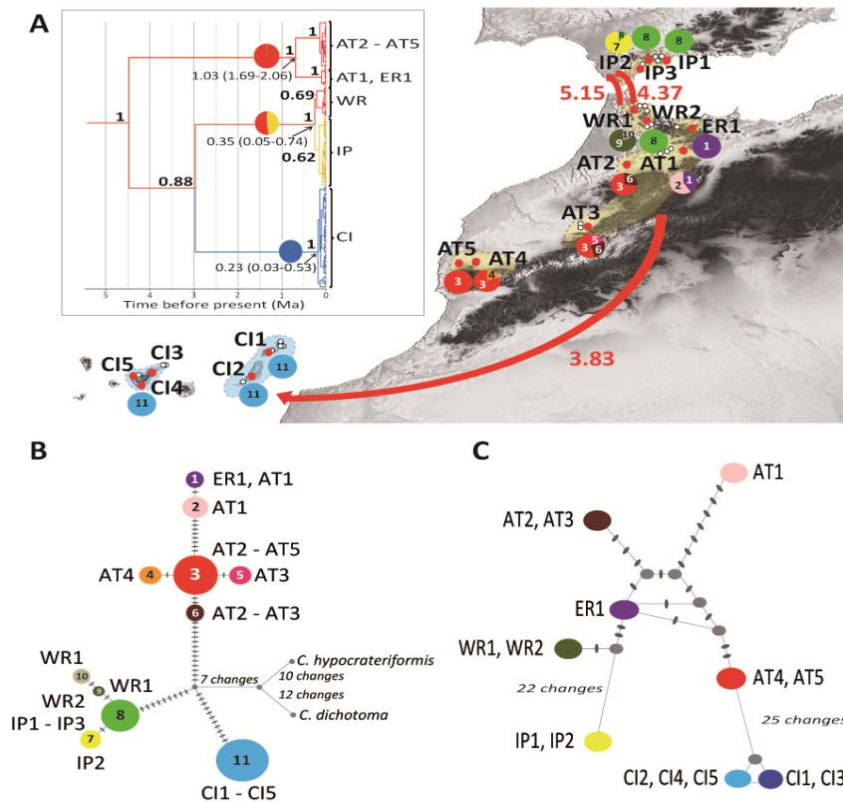


Figure 3. (A) Time-calibrated tree and map representing the distribution of plastid haplotypes and BSSVS analysis of *Campanula kremeri* and *C. occidentalis*, showing migration events with a BF support > 3. The sampled localities are showed as red spots, and the herbaria records as small white spots. Inside the square a Coalescent MCC tree showing the results of the plastid BSSVS analysis. Branch colour indicates the ancestral range with the highest posterior probability for each lineage. Numbers above branches indicate the Bayesian PP. (B) TCS network of plastid markers (*rpl32-trnL* and *trnS-trnG*), each haplotype has a colour. Black stripes represent the nucleotide changes, and the circle size is proportional to the number of individuals for each haplotype (Table 1). (C) Median network of nuclear markers (ITS and PPR11) implemented in Network 4.2.0.143 using the same accessions as in Figure 2.

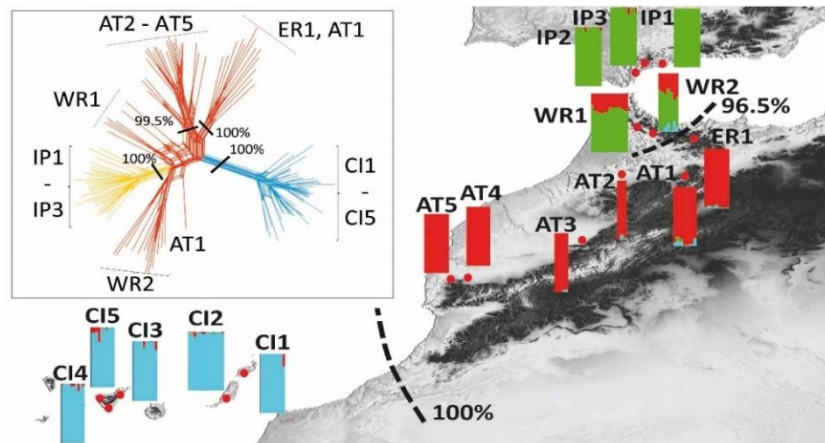


Figure 4. Results from the analysis of AFLP markers using $K = 3$ of *Campanula kremeri* and *C. occidentalis*. Histograms show the Bayesian clustering of individuals within populations (structure), colours represent the individual membership to each inferred Bayesian group. Dotted lines indicate the barriers to gene flow and their percentage, as inferred by BARRIER. Inside the square is represented the Neighbour-Net analysis inferred for individuals and populations using Splitstree v. 4.10.

4.2. Evolutionary origins of *Campanula kremeri* and *C. occidentalis*

The evolutionary origins of *Campanula kremeri* and sister-species *C. occidentalis* are an interesting case study to investigate plant evolutionary dynamics in north-west Africa. Phylogeographical analyses suggest that the disjunct distribution of this lineage originated from the dispersal events out of north-west Africa to nearby regions, the Iberian Peninsula and Canary Islands. Specifically, the plastid network presents one haplotype (H8) shared by the Iberian populations of *C. kremeri* and those inhabiting the western Rif Mountains (Fig. 3A,B), and the AFLP data also supports a link between these two groups of populations (Fig. 4). Thus, the disjunct distribution across the Strait of Gibraltar observed in *C. kremeri* is probably the result of relatively recent colonization from the Maghrebian massifs during Pleistocene climatic oscillations. Low genetic diversity and the small number of private fragments found in the Iberian populations of *C. kremeri* also agree with this hypothesis. Levanter winds (Dorman *et al.*, 1995) and sea-level drops (c. 150 m, Lambeck *et al.*, 2002) could have facilitated the dispersal of the dust like seeds of *C. kremeri* between the Rif and the Iberian Peninsula. Our study thus agrees with the hypothesis that the Strait of Gibraltar is not an impermeable barrier for annual species, in contrast to perennial ones, which show stronger genetic breaks (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2008).

In addition to the role of Maghrebian massifs as a source for dispersal events, phylogeographical analysis of plastid and nuclear markers indicate that they could have acted as climatic refuges preserving population genetic diversity during the past climatic fluctuations. According to the central-marginal hypothesis (Eckert *et al.*, 2008), genetic diversity and structure should be higher in areas that constitute refugia because of the preservation of genotypes that went extinct in other areas and the long-term persistence of populations (Hewitt, 2000). The number of private fragments (an indicator of population persistence in isolation) and our haplotype diversity measures are higher for the Atlas and Rif populations of *C. kremeri* (Table 1). In these high-elevation regions, climatic shifts could have been compensated by vertical migration. Species-distribution modelling for northern African populations of *C. kremeri* predicts the changes in the geographical range between glacial and interglacial periods during the Pleistocene (Fig. S6), i.e., a general range contraction during warm interglacial phases that did not affect the mountain ranges close to the Strait of Gibraltar. Pleistocene range contraction-expansions in the Atlas and Rif mountain ranges have also been proposed to explain the maintenance of a geographical genetic structure in other north-west African taxa (Médail & Diadema, 2009; Husemann *et al.*, 2014), and in agreement with the ‘refugia within refugia’ hypothesis (Gómez & Lunt, 2007). In sum, our study suggests that the topographical heterogeneity of north-west Africa played a key role for both the emergence and maintenance of genetic biodiversity in these lineages. The most ancient range cores for *C. kremeri* – the mountains of the Rif and Middle Atlas – likely acted as climatic refuges in the successive climatic crisis that followed the Neogene climate cooling (Médail & Diadema, 2009; Molina-Venegas *et al.*, 2013), preserving population genetic diversity and constituting the source of founder events to nearby regions.

4.3. Colonization of the Canary Islands and climatic extinction

Divergence between *C. kremeri* and *C. occidentalis* is dated c. 3.7 Ma (2.3–7.4; Fig. 1), indicating an early dispersal event in the Late Miocene-Pliocene. This old stem-age contrasts with the surprisingly low genetic diversity values found

amongst populations within this species. A possible explanation – suggested for other North Africa-Macaronesian disjunct bellflowers (Mairal *et al.*, 2015) – is that the ancestor of the current populations of *C. occidentalis* became isolated in parts of the Atlantic coast of Maghreb with a Macaronesian type of climate after the Late Miocene aridification of the continent (Fig. S6; Médail & Diadema, 2009), and they would have dispersed only recently to the Canary archipelago. These putative continental ancestors would have later gone extinct (Mairal *et al.*, 2015), or may still persist in unknown locations in these poorly explored regions. This hypothesis is in agreement with our SDM reconstructions of the potential range of *C. occidentalis* during the LGM: two areas of the Atlantic coast relatively close to the Canary Islands were depicted as harbouring high climate suitability for this species during the Pleistocene LGM.

The strikingly low genetic diversity found in the Canary *C. occidentalis* compared with the North African populations of *C. kremeri* (Table 1) disagrees with other plant population studies, reporting higher genetic diversity in Macaronesia than in north-west Africa (e.g. García-Verdugo *et al.*, 2015). Depauperate genetic diversity in island plants compared with mainland species has been explained by multiple factors, including biological traits such as poor dispersal capacity and long generation times, physical characteristics of the archipelagos, or shorter times between founder events (Stuessy *et al.*, 2014). In contrast, both *C. kremeri* and *C. occidentalis* show efficient dispersal mechanisms and a high-selfing capacity (unpublished data), which could have contributed to the successful colonization of the Iberian Peninsula and the Canaries. Though we found no significant signature of a bottleneck in *C. occidentalis* (Table S4), these traits could have allowed the species to recover from genetic bottlenecks derived from founder events, permitting the subsequent accumulation of genetic variability (Stuessy *et al.*, 2014).

An interesting result of our analysis is the conflicting phylogenetic signal between the nuclear and plastid genomes for the position of *C. occidentalis*. Whereas the nuclear phylogeny shows an early split between a monophyletic *C. occidentalis* and the *C. kremeri* clade, the plastid markers show *C. occidentalis*

embedded within *C. kremeri* (Fig. 2A). Given the low level of gene flow inherent in plant plastid transmission (Wolfe *et al.*, 1987), phylogenetic history explained by the plastid compartment could predate the signal of an admixed nuclear compartment. Assuming maternal inheritance of plastids, the maternal progenitor lineage of the populations of *C. kremeri* from Atlas-eastern Rif could be the ancestor of all remaining populations, including the Canarian *C. occidentalis*. In contrast, the paternal progenitor could be affected by the reticulation of *C. kremeri* from Atlas-eastern Rif with *C. kremeri* from the western Rif (Fig. 2B). The haplotype networks (Fig. 3B,C) and the AFLP data suggest also introgression amongst the Atlas, eastern Rif, and western Rif populations (Figs 4 & S5). Though we cannot exclude incomplete lineage sorting (ILS) in the nuclear compartment as an alternative explanation, it should be noted that the AFLP results support also the introgression hypothesis; this technique is presumed to be more robust to ILS because of the numerous independently transmitted loci (Avice, 2004). Interestingly, these results (together with the species-distribution modelling) indicate that genetic barriers amongst populations in different North African mountain ranges of *C. kremeri* have not always been completely impermeable, likely favouring a higher genetic diversity, which in turn might have mitigated the risk of genetic bottlenecks during retraction periods.

5. Conclusions

Our study shows that the mountain ranges of the Rif and Middle Atlas acted as climatic refugia for *Campanula kremeri*, from where this species colonized other areas in northwest Africa, the Iberian Peninsula, and the Canary Islands. Repeated expansion–retraction cycles favoured gene flow across north-west African ranges and led to local accumulation of genetic variability; and the Strait of Gibraltar acted as a semi-permeable geographical barrier for *C. kremeri*. The relatively old age and low genetic diversity found in the Canarian endemic *C. occidentalis* suggest a recent dispersal origin from an ancestral population in the north-west African coast, further supported by a predicted range reduction during the LGM in species-distribution models. Comparative phylogeographical studies on other endemic

Mediterranean species with distribution in north-west Africa are needed to corroborate the conclusions reached here: (1) the role of the mountain massifs in north-west Africa as both climatic refugia for Mediterranean and Macaronesian plants and sources of colonization events during the Pleistocene climatic oscillations; and (2) the partial permeability of the Strait of Gibraltar for annual plant species, which likely favoured genetic differentiation.

References

- Alarcón, M., Roquet, C., García-Fernández, A., Vargas, P. & Aldasoro, J. J. (2013) Phylogenetic and phylogeographic evidence for a Pleistocene disjunction between *Campanula jacobaea* (Cape Verde Islands) and *C. balfourii* (Socotra). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, 828–836.
- Avise, J. C. (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. A. & Lemey, P. (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, **27**, 2910–2912.
- Bintanja, R., van de Wal, R. S. & Oerlemans, J. (2005) Modelled atmospheric temperatures and global sea levels over the past million years. *Nature*, **437**, 125–128.
- Blanco-Pastor, J. L., Vargas, P. & Pfeil, B. E. (2012) Coalescent simulations reveal hybridization and incomplete lineage sorting in Mediterranean *Linaria*. *PLoS ONE*, **7**, e39089.
- Bouckaert, R. R. (2010) DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **26**, 1372–1373.

- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1659.
- Collins, W. D. *et al.* (2006) The community climate system model version 3 (CCSM3). *Journal of Climate*, **19**, 2122–2143.
- Désamoré, A. *et al.* (2011) Out of Africa: north-westwards Pleistocene expansions of the heather *Erica arborea*. *Journal of Biogeography*, **38**, 164–176.
- Dorman, C. E., Beardsley, R. C. & Limeburner, R. (1995) Winds in the Strait of Gibraltar. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, **121**, 1903–1922.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007) Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Duggen, S., Hoernle, K., Van Den Bogaard, P., Rüpke, L. & Morgan, J. P. (2003) Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature*, **422**, 602–606.
- Eckert, C. G., Samis, K. E. & Loughheed, S. C. (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the centralmarginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, **17**, 1170–1188.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution and Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Farris, J. D., Källersjö, M. A., Kluge, G. & Bult, C. (1995) Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology*, **44**, 570–572.
- Fernández-Mazuecos, M. & Vargas, P. (2011) Genetically depauperate in the continent but rich in oceanic islands: *Cistus monspeliensis* (Cistaceae) in the Canary Islands. *PLoS ONE*, **6**, e17172.

- Fiz-Palacios, O. & Valcárcel, V. (2013) From Messinian crisis to Mediterranean climate: a temporal gap of diversification recovered from multiple plant phylogenies. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **15**, 130–137.
- García-Verdugo, C. *et al.* (2015) Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. *Molecular Ecology*, **24**, 726–741.
- Gómez, A. & Lunt, D.H. (2007) *Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula*. In S. Weiss and N. Ferrand(Eds.), *Phylogeography of Southern European Refugia* (pp. 155–188). Amsterdam: Springer.
- Hasumi, H. & Emori, S. (2004) *K-1 coupled gcm (miroc) description*. Tokyo: Center for Climate System Research, University of Tokyo.
- Heled, J. & Drummond, A. J. (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 570–580.
- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. & Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965–1978.
- Husemann, M., Schmitt, T., Zachos, F. E., Ulrich, W. & Habel, J. C. (2014) Palaeartic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaeartic biota. *Journal of Biogeography*, **41**, 81–94.
- Huson, D. H. & Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Ecology and Evolution*, **23**, 254–267.
- Huson, D. H. & Scornavacca, C. (2012) Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology*, **61**, 1061–1067.

- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. & Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, **33**, 511–518.
- Lambeck, K., Yokoyama, Y. & Purcell, T. (2002) Into and out of the Last Glacial Maximum: sea-level change during oxygen isotope stages 3 and 2. *Quaternary Science Reviews*, **21**, 343–360.
- Lavergne, S., Hampe, A. & Arroyo, J. (2013) In and out of Africa: how did the Strait of Gibraltar affect plant species migration and local diversification? *Journal of Biogeography*, **40**, 24–36.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J. & Suchard, M. A. (2009) Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Computational Biology*, **5**, e1000520.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Mairal, M. *et al.* (2015) Palaeo-islands as refugia and sources of genetic diversity within volcanic archipelagos: the case of the widespread endemic *Canarina canariensis* (Campanulaceae). *Molecular Ecology*, **24**, 3944–3963.
- Manni, F. & Guérard, E. (2004) *BARRIER, version 2.2 Manual*. Population Genetics team. Paris: Museum of Mankind.
- Matzke, N. J. (2014) Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. *Systematic Biology*, **63**, 951–970.
- Médail, F. & Diadema, K. (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.
- Molina-Venegas, R., Aparicio, A., Pina, F. J., Valdés, B. & Arroyo, J. (2013) Disentangling environmental correlates of vascular plant biodiversity in a Mediterranean hotspot. *Ecology and Evolution*, **3**, 3879–3894.

- Myers, P. G. & Haines, K. (2000) Seasonal and interannual variability in a model of the Mediterranean under derived flux forcing. *Journal of Physical Oceanography*, **30**, 1069–1082.
- Nei, M. & Li, W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 5269–5273.
- Nyman, Y. Y. (1991) Crossing experiments within the *Campanula dichotoma* group (Campanulaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **177**, 185–192.
- Olesen, J. M., Alarcón, M., Ehlers, B. K., Aldasoro, J. J. & Roquet, C. (2012) Pollination, biogeography and phylogeny of oceanic Island bellflowers (Campanulaceae). *Perspectives in Plant Ecology and Evolution Systematics*, **14**, 169–182.
- Ortiz, M. A. (2009) Phylogeographic patterns in *Hypochaeris* section *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) of the western Mediterranean. *Journal of Biogeography*, **36**, 1384–1397.
- Otto-Bliesner, B. L., Marshall, S. J., Overpeck, J. T., Miller, G. H. & Hu, A. (2006) Simulating Arctic climate warmth and icefield retreat in the last interglaciation. *Science*, **311**, 1751–1753.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. & Schapire, R. E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**, 231–259.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253–1256.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Rodríguez-Sánchez, F., Pérez-Barrales, R., Ojeda, F., Vargas, P. & Arroyo, J. (2008) The Strait of Gibraltar as a melting pot for plant biodiversity. *Quaternary Science Reviews*, **27**, 2100–2117.

- Rohlf, F. J. (1998) *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, v.1.80*. New York: Exeter Software.
- Roquet, C. *et al.* (2009) Reconstructing the history of Campanulaceae with a Bayesian approach to molecular dating and dispersal-vicariance analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**, 575–587.
- Sanmartín, I., Anderson, C. L., Alarcón, M., Ronquist, F. & Aldasoro, J. J. (2010) Bayesian island biogeography in a continental setting: the Rand Flora case. *Biology Letters*, **6**, 703–707.
- Stuessy, T. F., Takayama, K., López-Sepúlveda, P. & Crawford, D. J. (2014) Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **174**, 276–288.
- Valtueña, F. J., López, J., Álvarez, J., Rodríguez-Riaño, T. & Ortega-Olivencia, A. (2016) *Scrophularia arguta*, a widespread annual plant in the Canary Islands: a single recent colonization event or a more complex phylogeographic pattern? *Ecology and Evolution*, **6**, 4258–4273.
- Vekemans, X. (2002) *AFLP-SURV version 1.0*. Brussels: Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles.
- Vos, P., Hogers, R. & Bleeker, R. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407–4414.
- Whitlock, R., Hipperson, H., Mannarelli, M., Butlin, R. K. & Burke, T. (2008) An objective, rapid and reproducible method for scoring AFLP peak-height data that minimizes genotyping error. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 725–735.
- Wolfe, K. H., Li, W. H. & Sharp, P. M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **84**, 9054–9058.
- Zhang, Z. *et al.* (2014) Aridification of the Sahara Desert caused by Tethys Sea shrinkage during the Late Miocene. *Nature*, **513**, 401–404.

Supplementary Information

Table S1. Comparison of the genetic diversity values reported in species distributed in the three main areas studied: Macaronesia, Iberian Peninsula and north-west Africa. In the column "Habit", the following codes apply: "a" annual, "h" herbaceous perennial, "w" woody or suffrutescent perennial; in the Results: "A" means north-west Africa, "I" Iberian Peninsula, and "M" Macaronesia; and %PF corresponds to the Percentage of polymorphic fragments (number of private fragments).

Species and subspecies	Habit	Method	Locality	Results (A; I; M)	Nei diversity	% PF	Number of haplotypes	Reference
<i>Alyssum montanum</i>	w	AFLP	Maghreb	A > I	0.0696	-	---	Zozomová-Lihová <i>et al.</i> , 2014
			Iberian Peninsula		0.054–0.0609	-	---	
<i>Carex extensa</i>	h	AFLP	Maghreb	A > I	0.030–0.061	-	---	Escudero <i>et al.</i> , 2010
			Iberian Peninsula		0.017–0.059	-	---	
<i>Carex helodes</i>	h	AFLP	Maghreb	I > A	0.023–0.055	24.56	---	Escudero <i>et al.</i> , 2008
			Iberian Peninsula		0.047–0.137	67.54	---	
<i>Cistus ladanifer</i>	w	Plastid haplotypes (<i>trnS-trnG</i> , <i>trnK-matK</i>)	Maghreb	A > I	---	---	6	Guzmán & Vargas, 2008
			Iberian Peninsula		---	---	4	
<i>Cistus monspeliensis</i>	w	Plastid haplotypes (<i>trnS-trnG</i> , <i>psbK-trn</i>)	Maghreb	M > A = I	---	---	1	Fernández-Mazuecos & Vargas, 2011
			Canary Islands		---	---	10	
			Iberian Peninsula		---	---	1	
<i>Cytinus hypocistis</i>	h	AFLP	Maghreb	A > I	0.068–0.130	10.8–38.5	---	Vega <i>et al.</i> , 2008
			Iberian Peninsula		0.038–0.117	7.8–33.8	---	

<i>Erica arborea</i>	w	Plastid haplotypes (<i>rpl16</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>atpB-rbcL</i>)	Macaronesia	I > M > A	---	---	3	Désamoré <i>et al.</i> , 2011
			Maghreb		---	---	1	
			Iberian Peninsula		---	---	7	
<i>Erica scoparia</i>	w	Plastid haplotypes (<i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i>)	Macaronesia		---	---	9	Désamoré <i>et al.</i> , 2012
			Iberian Peninsula	M > I > A	---	---	4	
			Maghreb		---	---	1	
<i>Erophaca baetica</i>	h	AFLP	Maghreb	A > I	0.15	80.0 (2–13)	---	Casimiro-Soriguer <i>et al.</i> , 2010
			Iberian Peninsula		0.11	75.6 (1–10)	---	
<i>Hypochaeris glabra</i>	a	AFLP	Maghreb		0.06–0.13	10.5–40.7 (1–12)	---	Ortiz <i>et al.</i> , 2009
			Iberian Peninsula	A > M > I	0.02–0.14	3.1–47.2 (0–5)	---	
			Canary Is. (introduced)		0.032	6.4 (1)	---	
<i>Hypochaeris radicata</i>	a	AFLP	Maghreb	A > I	0.07–0.10	47.8–62.3 (0–10)	---	Ortiz <i>et al.</i> , 2008
			Iberian Peninsula		0.04–0.11	32.9–58.1 (0–4)	---	
<i>Hypochaeris salzmanii</i>	a	AFLP	Maghreb		0.07–0.16	42.3–69.4 (2–26)	---	Ortiz <i>et al.</i> , 2007
			Iberian Peninsula	A > I	0.04–0.12	40.6–59.1 (1–9)	---	

<i>Juniperus oxycedrus</i> ssp. <i>badia</i>	w	AFLP	Maghreb	I > A	0.650	-	---	Boratyński <i>et al.</i> , 2014
			Iberian Peninsula		0.679–0.696	-	---	
<i>Juniperus oxycedrus</i> ssp. <i>oxycedrus</i>	w	AFLP	Maghreb	I > A	0.753–0.763	-	---	Boratyński <i>et al.</i> , 2014
			Iberian Peninsula		0.764–0.768	-	---	
<i>Laurus nobilis</i>	w	Plastid haplotypes (<i>trnK-matK</i> , <i>trnD-trnT</i>)	Iberian Peninsula	I > A	---	---	2	Rodríguez-Sánchez <i>et al.</i> , 2009
			Maghreb		---	---	1	
<i>Myrtus communis</i>	w	Plastid haplotypes (<i>trnL-trnF</i> , <i>rpl2-trnH</i>)	Madeira Is.		---	---	1	Migliore <i>et al.</i> , 2012
			Azores Is.		---	---	3	
			Iberian Peninsula	A > I = M	---	---	4	
			Maghreb		---	---	2	
			Algeria and Tunisia		---	---	4	
<i>Olea europaea</i>	w	Plastid haplotypes (<i>trnSG indel 1</i> , <i>trnSG indel 2</i> , <i>atpB-rbcL</i> , <i>psbE-petL</i> , <i>rps16-trnQ</i>)	Macaronesia		---	---	10	García-Verdugo <i>et al.</i> , 2009
			Maghreb	M > I > A	---	---	4	
			Iberian Peninsula and Balearic Is.		---	---	5	
<i>Periploca laevigata</i>	w	Plastid haplotypes (<i>rbcl</i> , <i>matK</i> , <i>trnT-trnL</i> , <i>trnH-psbA</i>)	Canary Islands		---	---	4	García-Verdugo <i>et al.</i> , 2015
			Maghreb	M > I = A	---	---	1	
			Iberian Peninsula		---	---	1	

<i>Scrophularia arguta</i>	a	Plastid haplotypes (<i>psbJ-petA</i> , <i>trnH-psbA</i>)	Macaronesia	A > M > I	---	---	7	Valtueña <i>et al.</i> , 2016
			Maghreb		---	---	9	
			Iberian Peninsula		---	---	2	
			NE Africa		---	---	3	
<i>Sonchus pustulatus</i>	h	AFLP and plastid haplotypes (<i>trnL-ndhJ</i> , <i>accD-psaI</i>)	Iberian Peninsula	A > I	0.088–0.109	41.9–47.8	1	Silva <i>et al.</i> , 2015
			Maghreb		0.138–0.167	44.3–52.6	1	
<i>Stauracanthus boivinii</i>	h	Plastid microsatellites (<i>trnL-trnF</i> , IGS region)	Iberian Peninsula		---	---	6	Pardo <i>et al.</i> , 2008
			Maghreb	A > I	---	---	8	
<i>Stauracanthus genistoides</i>	h	Plastid microsatellites (<i>trnL-trnF</i> , IGS region)	Iberian Peninsula		---	---	28	Pardo <i>et al.</i> , 2008
			Maghreb	I > A	---	---	2	

Table S2. Localities of the sampled populations of *Campanula* and *Azorina* and GenBank accession numbers.

Species	Locality	Collector number	Coordinates	Sequences					
				<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>	<i>rpl32-trnL^{UAG}</i>	<i>petB-petD</i>	ITS	PPR11
<i>Azorina vidalii</i> (H. C. Watson) Feer	Azores Is., Terceira, Cuatro Ribeiras	J. Aldasoro, A21006	38°47'38"N, 27°13'24"W	EF088696	KC792460	KC792364	KC792322	AY322007, AY331420	KU962092
	Azores Is., Santa María, Ponta do Castelo	J. Aldasoro, A21000	36°55'49"N, 25°0'56"W	KJ910657	KJ910841	KJ910778	KJ910717	KU891992, KU892006	KU962093
	Azores Is., Flores, S ^a Cruz	J. Aldasoro, A21026	39°31'15"N, 31°12'24"W	KJ910658	KJ910842	KJ910779	KJ910718	KU891993, KU892007	KU962094
<i>Campanula atlantica</i> Batt	Algeria, East Tell, Guergou Gorge	J. Aldasoro, A19040	36°19'58"N, 5°03'48"E	KJ910659	KJ910843	KJ910780	KJ910719	KM042121	KU962113
<i>C. baborensis</i> Quézel	Algeria, East Tell, El Milia	J. Aldasoro, A19020	36°38'03"N, 6°16'31"E	KJ910660	KJ910844	KJ910781	KJ910720	KU891998, KU892012	KU962115
<i>C. balfourii</i> Wagner & Vierh	Yemen, Socotra, Qalansiyah	J. Aldasoro & A. Susanna, A16184 (M184)	12°39'29" N, 53°26'23" W	KC792352	KC792472	KC792376	KC792334	KM042122	KU962100
<i>C. bordesiana</i> Maire	Algeria, Hoggar, Tasakentl	J. Aldasoro, A9833	23°36'1.7" N, 5°58'21.5" E	KJ910661	KJ910845	KJ910782	KJ910721	KM042124	KU962103
<i>C. cashmeriana</i> Royle	Tajikistan, Pishambe	J. Aldasoro, A23057	38°44'26"N, 69°19'11" E	KJ910663	KJ910847	KJ910784	KJ910723	KU891990, KU892004	KU962089
<i>C. creutzburgii</i> Greuter	Greece, Crete, Dia	K. Alpinar (ISTE)	35°27'8"N, 25°13'1"E	EF088714	KJ910848	KJ910785	KJ910724	KM042125	KT753092
<i>C. dichotoma</i> L.	Spain, Ibiza, Cala Jondal	J. Aldasoro, A19018	38°52'3"N, 1°19'5"E	KJ910669	KJ910854	KJ910791	KJ910729	KU891995, KU892009	KU962102
<i>C. dimorphantha</i> Schweinf	Taiwan, Hualien: Hsiulin Hsiang, Chih-Chia	Wang, 1353 (LE)	24°21'24"N, 121°18'34"E	EF088708	KJ910856	KJ910793	KJ910731	KU891991, KU892005	KU962091
<i>C. drabifolia</i> Sibth. & Sm.	Greece, Laconia, Mistras	W01065	37°4'9"N, 22°22'17"E	KJ910671	KJ910857	KJ910794	KJ910732	KM042133	---
<i>C. edulis</i> Forsk	Yemen, Jabel Takar	J. Aldasoro & A. Susanna, A14581	13°53'45"N, 44°8'34"E	KJ910675	KJ910861	KJ910798	KJ910736	KU891996, KU892010	KU962105
	Ethiopia, Simien, Aisa	J. Aldasoro & M. Alarcón,	13°11'33"N, 37°53'23"E	KJ910678	KJ910864	KJ910801	KJ910739	KM042136	KU962104

	Ketana, N Debark	A9997							
<i>C. embergeri</i> Litard. & Maire	Morocco, High Atlas, N Tizi n' Test	J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9578	30° 52' 30,25" N, 8°21'26"W	KJ910679	KJ910865	KJ910802	KJ910740	KM042137	KU962111
<i>C. filicaulis</i> Durieu	Morocco, High Atlas, Tizi n' Tichka	J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A11138	31°17'3.85"N, 7°22'57.42"W	KJ910683	KJ910869	KJ910806	KJ910744	KM042143	KU962107
<i>C. guinochetii</i> Quézel	Morocco, Middle Atlas, Ait Bougammaz, Tizi n' Targuist	N. Montes, A10468	31° 44'26"N, 6° 19'31"W	KJ910686	KJ910872	KJ910809	KJ910747	KM042147	KU962109
<i>C. hypocrateriformis</i> Dobignard	Morocco, Agadir, NW of Tiznit, Jebel Imzii	J. Aldasoro, A6911	29°45' 7"N, 9°17' 1"W	KC792342	KC792462	KC792366	KC792324	KM042148	KU962099
<i>C. jacobaea</i> C. E. Sm. & Hook	Cape Verde Is, S. Antão, Cova	J. Aldasoro & M. Alarcón, A9291	17° 6'18.15"N, 25°3'30.59"W	KC792358	KC792534	KC792438	KC792340	KU891989, KU892013	KU962098
<i>C. keniensis</i> Thulin	Kenya, NE Nanyuki, Ogdarvale Farm	Gilbert, 4900 (National Museums of Kenya)	0°46'N, 41°15'E	KJ910689	KJ910875	---	JX915070	KU891994, KU892008	KU962101
<i>C. kremeri</i> Boiss. & Reut	Spain, Málaga, Istán,	J. Aldasoro & M. Alarcón, A6994 (1-10)	36°32'14.06"N, 4°57'02.05"W	KX009152	KU867392- KU867401	KU867308- KU867317	KX009159	KU892000, KU892014	KU962096
	Spain, Málaga, S. Pedro de Alcántar-Ronda	J. Aldasoro & M. Alarcón, A6992 (1-12)	36°32'01.08"N, 5°00'28"W	---	KU867402- KU867413	KU867318- KU867329	---	---	---
	Spain, Málaga, Benarrabá, track to el Genal,	J. Aldasoro & M. Alarcón, A6990 (1-12)	36°33'05.7"N, 5°15'20.4"W	KX009153	KU867414- KU867425	KU867330- KU867341	KX009160	KU962047, KU962056	KU962075
	Morocco, Rif, Jebel Tissouka, Chefchauen	J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A10556 (1-4)	35°10'36"N, 5°15'57"W	KJ910691	KJ910877, KU867426- KU867428	KJ910813, KU867342- KU867344	KJ910751	KM042153, KU962057	KU962076
		J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A90679-90680	35°10'36"N, 5°15'57"W	KX009154	KU867429- KU867430	KU867345- KU867346	KX009161	KU962048	---
	Morocco, Rif, Talassemthane, Chefchauen,	R. Vilatersana, SM 88, A23116 (1-10)	35° 04,624'N, 5°10,011' W	KX009155	KU867431- KU867440	KU867347- KU867356	KX009162	KU962049	KU962077
	Morocco, Rif, Alhoceima, Taounate	J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A11110 (2,3,7,8)	34°47'26"N, 4°27'52"W	KC792344	KC792464, KU867441- KU867444	KC792368, KU867357- KU867360	KC792326	KM042154, KU962050, KU962059	KU962078

	Morocco, Mulay Idris, Zerhoun	Jury, 15073, BC 906777(1-3)	34°3' 10"N, 5°30' 5"W	KX009156	KU867450- KU867452	KU867366- KU867368	KX009163	KU962053, KU962062	KU962081
	Morocco, Middle Atlas, Taza, Sidi Abdullah	J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A11112 (2-6)	34°13'24.28"N, 4°0'21.20"W	KJ910693	KJ910879, KU867445- KU867449	KJ910815, KU867361- KU867365	KJ910753	KM042155, KU962051, KU962060	KU962079
	Morocco, Middle Atlas, Afourer, Bin el Ouidane	S. Cirujano <i>et al.</i> ,10331 (BC906875) (1-4) and A11111(2-4)	32°11'24"N, 6°30'31"W	KC792345	KC792465, KU867453- KU867459	KC792369, KU867369- KU867375	KC792327	KU962052, KU962061	KU962080
	Morocco, High Atlas, Oued Mrabet	J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A23111	31°33'16.65"N, 9°10'34.06"W	KJ910694	KJ910880, KU867467- KU867475	KJ910816, KU867383- KU867391	KJ910754	KU962051, KU962063	KU962082
	Morocco, High Atlas, Chichaoua-Essauira	A. Hipold, AH1029, A23114	31°33'18"N, 8°50'50"W	KJ910695	KJ910881, KU867460- KU867466	KJ910817, KU867376- KU867382	KJ910755	KU892001, KU892015, KU962055, KU962064	KU962083, KU962097
<i>C. lehmanniana</i> Bunge	Afghanistan, Khost, Narai Kotal	Rechinger, s.n. (W)	33°28'7"N, 69°54'4"E	KJ910696	KM042156	KJ910818	KJ910756	KM042156	KU962090
<i>C. mollis</i> L. var <i>velutina</i>	Spain, Almería, Gador, Berja	J. Aldasoro, 6676	36°50'43.54"N, 2°55'22.38"W	KJ910697	KJ910882	KJ910819	KJ910757	KM042157	KU962117
<i>C. mollis</i> L. var <i>oranensis</i>	Algeria, Orán, S ^a Cruz	J. Aldasoro, A20007	35°42'34.34"N, 0°39'48.42"W	KJ910702	KJ910887	KJ910824	KJ910762	KM042160	KU962116
<i>C. monodiana</i> Maire	Chad, Tibesti Mts, Tousside	J. Aldasoro, A30026	21°2'13"N, 16°28'27"E	KJ910703	KJ910888	KJ910825	KJ910763	---	---
<i>C. numidica</i> Durieu	Algeria, Constantina	J. Aldasoro, A19027	36°22'27"N, 6°36'42"E	KJ910704	KJ910889	KJ910826	KJ910764	KU891997, KU892011	KU962114
<i>C. occidentalis</i> Y.Nyman	Spain, Canary Is., Lanzarote, <u>Siete</u> Leguas	J. Molero & A. Rovira 2013 (BCN)	29°11'6.04"N, 13°27'11"W	KJ910705	KJ910890, KU867526- KU867535	KJ910827, KU867476- KU867485	KJ910765	KU962066, KU962071	KU962085
	Spain, Canary Is., Fuerteventura, Pájara	Sholtz, 26011 (A18990)	28°20'55.19"N, 14°6'24.7"W	KC792343	KC792463, KU867536- KU867546	KC792367, KU867486- KU867496	KC792325	KM042161, KU962065, KU962070	KU962084, KU962095

	Spain, Canary Is., Tenerife, Anaga	J. Molero & A. Rovira, 2013 (BCN)	28°30'56.5"N, 16°10'20.4"W	KX009157	KU867547- KU867555	KU867497- KU867505	KX009164	KU962068, KU962073	KU962087
	Spain, Canary Is., Tenerife, Guimar	J. Molero & A. Rovira, 2013 (BCN)	28°18'12.4"N, 16°26'33.7"W	KX009158	KU867556- KU867565	KU867506- KU867515	KX009165	KU962069, KU962074	KU962088
	Spain, Canary Is., Tenerife, Masca	J. Molero & A. Rovira, 2013 (BCN)	28°18'13"N, 16°50'28.39"W	KJ910706	KJ910891, KU867566- KU867575	KJ910828, KU867516- KU867525	KX009166	KU962067, KU962072	KU962087
<i>C. sauvagei</i> Quézel	Morocco, High Atlas, Demnate, Ou Agga	N. Montes, A9701	31°43'36.8"N, 6°58'19.75"W	KJ910707	KJ910894	KJ910831	KJ910768	KM042164	KU962110
<i>C. saxifragoides</i> Doumergue	Morocco, Anti Atlas, Jebel Sahrho	J. Calleja, JC3059	31°10'8.00"N, 5°41'23.00"W	KJ910709	KJ910896	KJ910833	KJ910770	KM042166	KU962108
<i>C. serhouchenensis</i> Dobignard	Morocco, Middle Atlas, Col du Zad	J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9531	32°58'40.17"N, 5° 7'25.7" W	KJ910710	KJ910897	KJ910834	KJ910771	KM042167	KU962106
<i>C. sibirica</i> L.	Armenia, Syunik,	Gonzalo, 127 (MA)	39°06'33.0"N, 46°18'53" W	KC792341	KC792455	KC792359		KU891988, KU892002	---
<i>C. vaillantii</i> Quézel	Morocco, High Atlas, N Tizi n' Test	J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A9579 A18971	30° 52' 24" N, 8° 21' 25" W	KJ910713	KJ910900	KJ910837	KJ910774	KM042170	KU962112
<i>C. velata</i> Pomel	Morocco, Oujda, Beni Snassen, Jebel Fouaga	J. Molero & J. Montserrat, JMM9579 (BCN)	34°38'43.44"N, 1°55'20.2"W	KJ910714	KJ910901	KJ910838	KJ910775	KM042171	KU962118

Table S3. Specific primer pairs used in the amplification and sequencing of nuclear and plastid markers in *Campanula occidentalis* and *C. kremeri*.

Primer name's	Primer Sequence (5'-3')	Authors
<i>trnS</i> ^{GCU} -F	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	Hamilton, 1999
<i>trnG</i> ^{UCC} -R	GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C	Hamilton, 1999
<i>petB</i> ¹³⁶⁵ -F	TTG ACY CGT TTT TAT AGT TTA	Löhne & Borsch, 2005
<i>petD</i> ⁷³⁸ -R	AAT TTA GCY CTT AAT ACA GG	Löhne & Borsch, 2005
<i>rpl32</i> -F	CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C	Shaw <i>et al.</i> , 2007
<i>trnL</i> ^{UAG} -R	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT	Shaw <i>et al.</i> , 2007
<i>PPR11</i> -F	TTT GTT ATG TTG ATK TGG GTT TT	Crowl, <i>et al.</i> , 2014
<i>PPR70</i> -R	ACA GCT CKR ACA AGT ATR TTC CA	Crowl, <i>et al.</i> , 2014
<i>ITS1</i> -F	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> 1990
<i>ITS4</i> -R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> 1990

Table S4. Genetic parameters for genetic diversity and population size according to the plastid haplotype dataset in the four groups found in *C. kremeri* and *C. occidentalis*. The following codes apply: *n* for the number of samples, PS for the number of polymorphic sites and π for the nucleotide diversity, n.s. for non significative.

	<i>n</i>	PS	π	Fu & Li D	Fu & Li F	Fu's Fs	Tajima D	Raggedness
<i>C. kremeri</i> , Iberian Peninsula (Istan, S. Pedro and Benarrabá)	34	1	0.00032	0.58 (n.s.)	0.888 (n.s.)	1.50	1.266 (n.s.)	0.580 (n.s.)
<i>C. kremeri</i> , Atlas and E Rif (Al Hoceima, Taza, Afourer, Mulay Idris, Chichaoua, and Oued Mrabet)	35	12	0.00283	0.49 (n.s.)	0.608 (n.s.)	0	2.658 (n.s.)	0.095 (n.s.)
<i>C. kremeri</i> , W Rif (J. Tissouka and Talassemtane)	15	2	0.00043	-0.476 (n.s.)	-0.408 (n.s.)	-0.06	-0.023 (n.s.)	0.311 (n.s.)
<i>C. occidentalis</i> Canary Islands	50	0	0.00032	0.58 (n.s.)	-	-	-	-

Table S5. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) for *Campanula occidentalis* and *C. kremeri* based on AFLPs variation at different levels: (Va) among groups, (Vb) among populations within groups and (Vc) within populations. The %var refers to the percentage of variation.

Groups used in AMOVA comparisons	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	%var	Φ Statistics
AMOVA for all populations						
1 group	Among populations	17	8568.526	58.86700 Va	56.08	-
	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vb	43.92	$\Phi_{ST}= 0.561$
	Total	140	14240.184	104.97804		
2 groups						
1. C. kremeri	Among groups	1	3431.484	46.73080 Va	36.36	$\Phi_{CT}= 0.364$
	Among populations within groups	16	5137.042	35.66951 Vb	27.76	$\Phi_{SC}= 0.436$
	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	35.88	$\Phi_{ST}= 0.641$
2. C. occidentalis	Total	140	14240.184	128.51136		
3 groups						
1. Maghreb (Atlas + Rif)	Among groups	2	4921.460	47.35170 Va	39.65	$\Phi_{CT}= 0.396$
	Among populations within groups	15	3647.066	25.97527 Vb	21.75	$\Phi_{SC}= 0.360$
	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	38.61	$\Phi_{ST}= 0.613$
2. Iberian Peninsula	3. Canary Is.	Total	140	14240.184	119.43801	
1. Rif plus Iberian Peninsula	Among groups	2	5236.791	51.49147 Va	42.74	$\Phi_{CT}= 0.427$
	Among populations within groups	15	3331.735	22.86770 Vb	18.98	$\Phi_{SC}= 0.33152$
	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	38.28	$\Phi_{ST}= 0.617$
2. Atlas	3. Canary Is.	Total	140	14240.184	120.47022	
1. Rif plus Canary Is.	Among groups	2	4066.228	39.02334 Va	32.96	$\Phi_{CT}= 0.330$
	Among populations within groups	15	4502.298	33.25466 Vb	28.09	$\Phi_{SC}= 0.419$
	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	38.95	$\Phi_{ST}= 0.611$
2. Atlas	3. Iberian Peninsula	Total	140	14240.184	118.38904	

4 groups						
1. W Rif and Iberian Peninsula	Among groups	3	5902.946	55.23041 Va	46.06	$\Phi_{CT} = 0.461$
2. AT1 & ER1	Among populations within groups	14	2665.580	18.55940 Vb	15.48	$\Phi_{SC} = 0.287$
3. AT2, AT3, AT4 & AT5	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	38.46	$\Phi_{ST} = 0.615$
4. Canary Is.	Total	140	14240.184	119.90085		
<hr/>						
1. Iberian Peninsula	Among groups	3	5952.243	52.15494 Va	44.66	$\Phi_{CT} = 0.447$
2. W Rif	Among populations within groups	14	2616.284	18.52706 Vb	15.86	$\Phi_{SC} = 0.287$
3. Atlas	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	39.48	$\Phi_{ST} = 0.605$
4. Canary Is.	Total	140	14240.184	116.79304		
<hr/>						
1. Iberian Peninsula	Among groups	3	5802.515	50.34904 Va	43.29	$\Phi_{CT} = 0.433$
2. WR1, WR2, AT1 & ER1	Among populations within groups	14	2766.012	19.85365 Vb	17.07	$\Phi_{SC} = 0.301$
3. AT2, AT3, AT4 & AT5	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	39.64	$\Phi_{ST} = 0.604$
4. Canary Is.	Total	140	14240.184	116.31373		
<hr/>						
1. IP1, IP2, IP3, WR1, WR2 & ER1	Among groups	3	5308.022	50.05908 Va	41.72	$\Phi_{CT} = 0.417$
2. AT1, AT2 & AT3	Among populations within groups	14	3260.504	23.81544 Vb	19.85	$\Phi_{SC} = 0.341$
3. AT4 & AT5	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	38.43	$\Phi_{ST} = 0.616$
4. Canary Is.	Total	140	14240.184	119.98556		
<hr/>						
1. W Rif plus Canary Is.	Among groups	3	4673.520	41.65205 Va	35.32	$\Phi_{CT} = 0.353$
2. AT1, AT2, AT3 & ER1	Among populations within groups	14	3895.006	30.17118 Vb	25.58	$\Phi_{SC} = 0.396$
3. AT4 & AT5	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	39.10	$\Phi_{ST} = 0.609$
4. Iberian Peninsula	Total	140	14240.184	117.93427		
<hr/>						
5 groups						
1. W Rif	Among groups	4	6559.535	55.45174 Va	47.91	$\Phi_{CT} = 0.479$
2. AT1, AT2, AT3 & ER1	Among populations within groups	13	2008.992	14.16896 Vb	12.24	$\Phi_{SC} = 0.235$
3. AT4 & AT5	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	39.84	$\Phi_{ST} = 0.602$
4. Iberian Peninsula	Total	140	14240.184	115.73174		
5. Canary Is.						

1. W Rif	Among groups	4	6618.397	56.36813 Va	48.59	$\Phi_{CT} = 0.486$
2. AT1 & ER1	Among populations within groups	13	1950.129	13.53912 Vb	11.67	$\Phi_{SC} = 0.227$
3. AT2, AT3, AT4 & AT5	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	39.74	$\Phi_{ST} = 0.605$
4. Iberian Peninsula						
5. Canary Is.	Total	140	14240.184	116.01828		

1. W Rif and ER1	Among groups	4	6154.728	51.08717 Va	44.33	$\Phi_{CT} = 0.443$
2. AT1, AT2 & AT3	Among populations within groups	13	2413.798	18.03233 Vb	15.65	$\Phi_{SC} = 0.281$
3. AT4 & AT5	Within populations	123	5671.658	46.11104 Vc	40.02	$\Phi_{ST} = 0.600$
4. Iberian Peninsula						
5. Canary Is.	Total	140	14240.184	115.23054		

Table S6. Localities used for SDM analysis in *C. kremeri* and *C. occidentalis*.

Species	Locality	Herbarium material or record	Coordinates
<i>C. kremeri</i> Boiss. & Reut, Iberian Peninsula			
	Spain, Málaga, Istán,	J. Aldasoro & M. Alarcón, A6994	36°32'14.06"N, 4°57'02.05"W
	Spain, Málaga, S. Pedro de Alcántara-Ronda	J. Aldasoro & M. Alarcón, A6992	36°32'01.08"N, 5°00'28"W
	Spain, Málaga, Benarrabá, track to el Genal,	J. Aldasoro & M. Alarcón, A6990	36°33'05.7"N, 5°15'20.4"W
	Spain, Málaga, Benahavís, S ^a Palmitera	F. Casas, s.n.	36°35'24.00"N, 5° 4'12.00"W
	Spain, Málaga, Tolox	Pérez Latorre, s.n.	36°40'50.83"N, 4°58'14.17"W
	Spain, Málaga, S ^a de las Nieves, Cueva del Agua. Yunquera	Pérez Latorre, s.n.	36°39'36.00"N, 5° 0'36.00"W
	Spain, Málaga, Faraján; Río Genal	J. Aldasoro & M. Alarcón, A7010	36°36'57.60"N, 5°11'9.60"W
	Spain, Málaga, Casares	J. Aldasoro & M. Alarcón, A6995	36°25'25.90"N, 5°19'32.90"W
<i>C. kremeri</i> Boiss. & Reut, Maghreb			
	Morocco, W Rif, Jebel Tissouka, Chefchaouen	J. Aldasoro, M. Alarcón, J. Molero & L. Sáez, A90679	35°10'36"N, 5°15'57"W
	Morocco, W Rif, Talassemtane, Chefchaouen,	R. Vilatersana, SM 88, A23116	35° 04,624'N, 5° 10,011' W
	Morocco, W Rif, Tetouan, Derdara	(BC s.n.)	35° 6'32.87"N, 5°17'11.75"W
	Morocco, W Rif, Tanger-Tetouan, Aguelman	MS1007 (MA)	35° 22'7.6"N, 5°22'25.1"W
	Morocco, W Rif, Tetouan, Derdara to Chefchaouen	Jury & Shkwa, 20972	35° 6'49.32"N, 5°17'12.93"W
	Morocco, W Rif, Chefchaouen, Tarsif	Mateos, Ramos & Villarreal, 5715/95	35°26'28.11"N, 5° 6'9.79"W
	Morocco, W Rif, Chefchaouen, Targha-Bou Ahmed	Caruz, Mateos & Pina, 906796	35°21'18.14"N, 5° 1'37.43"W
	Morocco, W Rif, Chefchaouen, Chefchaouen-Oued-Laou	Talavera, Arista, Murillo, Gibbs & Lughadha, 906792	35°22'32.03"N, 5° 9'31.14"W
	Morocco, E Rif, Al Hoceima-Taounate	Calvo, 2567 (MA781997)	34°15'19.81"N, 4°14'1.90"W
	Morocco, E Rif, Al Hoceima, Taounate	J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A11110	34°47'26"N, 4°27'52"W
	Morocco, Mulay Idris, Zerhoun	Jury, 15073 (BC 906777)	34°3' 10"N, 5°30' 5"W

Morocco, Middle Atlas, Taza, Sidi Abdullah	J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A11112	34°13'24.28"N, 4°0'21.20"W
Morocco, Middle Atlas, Taza, between Tahala and Tissa	Montserrat & Valdés, 2533/94	34°11'57.16"N, 4°15'18.20"W
Morocco, Middle Atlas, Taza-Tahala	BC906877	34° 2'19.19"N, 4°24'4.41"W
Morocco, Middle Atlas, Taza, Taounate	BC906791	34°43'40"N, 4°7'41"W
Morocco, Middle Atlas, Taza, Taounate	BC906791	34°43'40"N, 4°7'41"W
Morocco, High Atlas, Afourer, Bin el Ouidane	S. Cirujano <i>et al.</i> ,10331 (BC906875) and A11111	32°11'24"N, 6°30'31"W
Morocco, High Atlas, Afourer-Bin El Ouidane	MA	32° 6'42.52"N, 6°27'46.58"W
Morocco, High Atlas, Afourer	J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A11111	32°12'23.66"N, 6°32'18.49"W
Morocco, Western High Atlas, Oued Mrabet	J. Aldasoro, J. Molero & J. Calleja, A23111	31°33'16.65"N, 9°10'34.06"W
Morocco, Western High Atlas, Chichaoua-Essauira	A. Hipold, AH1029, A23114	31°33'18"N, 8°50'50"W

C. *occidentalis* Y.Nyman, Canary Islands

Spain, Tenerife, Anaga, Las Gaviotas	J. Molero & A. Rovira, 2013 (BCN)	28°30'56.59"N, 16°10'20.36"W
Spain, Tenerife, Guimar	J. Molero & A. Rovira, 2013 (BCN)	28°18'12.46"N, 16°26'33.66"W
Spain, Tenerife, Masca	J. Molero & A. Rovira, 2013 (BCN)	28°18'13"N, 16°50'28.39"W
Spain, Tenerife, Las Mercedes	Ehrendorfer, 8 (W)	28°6'36"N, 14°23'24"W
Spain, Tenerife, Masca	Lindblad, s.n.	28°18'15.80"N, 16°50'30.73"W
Spain, Tenerife, Anaga	Ryman, 1340 (UPS)	28°29'18.86"N, 16°16'24.97"W
Spain, Tenerife, El Balayo, Anaga	University of Aarhus LHN-163 (AAU)	28°22'0.82"N, 16°31'16.75"W
Spain, Tenerife, Masca, Roque de Catana	Stork, s.n. (S)	28°17'46.09"N, 16°51'42.43"W
Spain, Fuerteventura, Pico de la Zarza, Valle Vinama	Sventenius, s.n. (ORT)	28°5'56.26"N, 14°21'18.56"W
Spain, Fuerteventura, Playa de Cofete	I. Álvarez, J. Calvo & B. Ríos, JC2062 (MA)	28°5'56.26"N, 14°21'18.56"W
Spain, Lanzarote, Pico Siete Leguas	J. Molero & A. Rovira, 2013 (BCN)	29°11'6.04"N, 13°27'11"W

Spain, Lanzarote, Cueva de los Verdes in Haria	Andreas, s.n. (M)	29° 9'41.88"N, 13°26'31.66"W
Spain, Lanzarote, Haria, Masdache	Sventenius, s.n. (ORT)	28°59'30.10"N, 13°39'29.24"W
Spain, Lanzarote, Road to Órzola	Kunkel, s.n. (G)	29°12'11.45"N, 13°27'20.83"W
Spain, Lanzarote, Orapuis de la Corona	Kunkel, s.n. (G)	29°11'50.55"N, 13°28'22.72"W

References

- Boratyński, A. *et al.* (2014) The biogeography and genetic relationships of *Juniperus oxycedrus* and related taxa from the Mediterranean and Macaronesian regions. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **174**, 637–653.
- Casimiro-Soriguer, R. *et al.* (2010) Phylogeny and genetic structure of *Erophaca* (Leguminosae), a East–West Mediterranean disjunct genus from the Tertiary. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**, 441–450.
- Crowl, A. A., Miles, N. W., Visger, C. J., Hansen, K., Ayers, T., Haberle, R. & Cellinese, N. (2016) A global perspective on Campanulaceae: Biogeographic, genomic, and floral evolution. *American Journal of Botany*, **103**, 233–245.
- Désamoré, A. *et al.* (2011) Out of Africa: north-westwards Pleistocene expansions of the heather *Erica arborea*. *Journal of Biogeography*, **38**, 164–176.
- Désamoré, A. *et al.* (2012) Inverted patterns of genetic diversity in continental and island populations of the heather *Erica scoparia* sl. *Journal of Biogeography*, **39**, 574–584.
- De Vega, C. *et al.* (2008) Genetic races associated with the genera and sections of host species in the holoparasitic plant *Cytinus* (Cytinaceae) in the Western Mediterranean basin. *New Phytologist*, **178**, 875–887.

- Escudero, M., Vargas, P., Valcárcel, V. & Luceño, M. (2008) Strait of Gibraltar: an effective gene-flow barrier for wind-pollinated *Carex helodes* (Cyperaceae) as revealed by DNA sequences, AFLP, and cytogenetic variation. *American Journal of Botany*, **95**, 745–755.
- Escudero, M., Vargas, P., Arens, P., Ouborg, N. J. & Luceño, M. (2010) The east-west-north colonization history of the Mediterranean and Europe by the coastal plant *Carex extensa* (Cyperaceae). *Molecular Ecology*, **19**, 352–370.
- Fernández-Mazuecos, M. & Vargas, P. (2011) Genetically depauperate in the continent but rich in oceanic islands: *Cistus monspeliensis* (Cistaceae) in the Canary Islands. *PLoS One*, **6**, e17172.
- García-Verdugo, C. *et al.* (2009) Genetic diversity and differentiation processes in the ploidy series of *Olea europaea* L.: a multiscale approach from subspecies to insular populations. *Molecular Ecology*, **18**, 454–467.
- García-Verdugo, C. *et al.* (2015) Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. *Molecular Ecology*, **24**, 726–741.
- Guzmán, B. & Vargas, P. (2009) Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography*, **36**, 954–968.
- Hamilton, M. (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521–523.
- Löhne, C. & Borsch, T. (2005) Molecular evolution and phylogenetic utility of the *petD* group II intron: a case study in basal angiosperms. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 317–332.

- Migliore, J., Baumel, A., Juin, M. & Médail, F. (2012) From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography*, **39**, 942–956.
- Ortiz, M. A., Tremetsberger, K., Talavera, S., Stuessy, T. & García-Castaño, J. L. (2007) Population structure of *Hypochaeris salzmanniana* DC. (Asteraceae), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. *Molecular Ecology*, **16**, 541–552.
- Ortiz, M. A. *et al.* (2008) Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to worldwide introduced populations. *Molecular Ecology*, **17**, 3654–3667.
- Ortiz, M. A. *et al.* (2009) Phylogeographic patterns in *Hypochaeris* section *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) of the western Mediterranean. *Journal of Biogeography*, **36**, 1384–1397.
- Pardo, C., Cubas, P. & Tahiri, H. (2008) Genetic variation and phylogeography of *Stauracanthus* (Fabaceae, Genisteae) from the Iberian Peninsula and northern Morocco assessed by chloroplast microsatellite (cpSSR) markers. *American Journal of Botany*, **95**, 98–109.
- Rodríguez-Sánchez, F., Guzmán, B., Valido, A., Vargas, P. & Arroyo, J. (2009) Late Neogene history of the laurel tree (*Laurus* L., Lauraceae) based on phylogeographical analyses of Mediterranean and Macaronesian populations. *Journal of Biogeography*, **36**, 1270–1281.
- 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.

Silva, J. L., Lim, S. Y., Kim, S. C. & Mejías, J. A. (2015) Phylogeography of cliff-dwelling relicts with a highly narrow and disjunct distribution in the western Mediterranean. *American Journal of Botany*, **102**, 1538–1551.

Valtueña, F. J., López, J., Álvarez, J., Rodríguez-Riaño, T. & Ortega-Olivencia, A. (2016) *Scrophularia arguta*, a widespread annual plant in the Canary Islands: a single recent colonization event or a more complex phylogeographic pattern? *Ecology and Evolution*, **6**, 4258–4273.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18**, 315–322.

Zozomová-Lihová, J., Marhold, K. & Španiel, S. (2014) Taxonomy and evolutionary history of *Alyssum montanum* (Brassicaceae) and related taxa in southwestern Europe and Morocco: Diversification driven by polyploidy, geographic and ecological isolation. *Taxon*, **63**, 562–591.

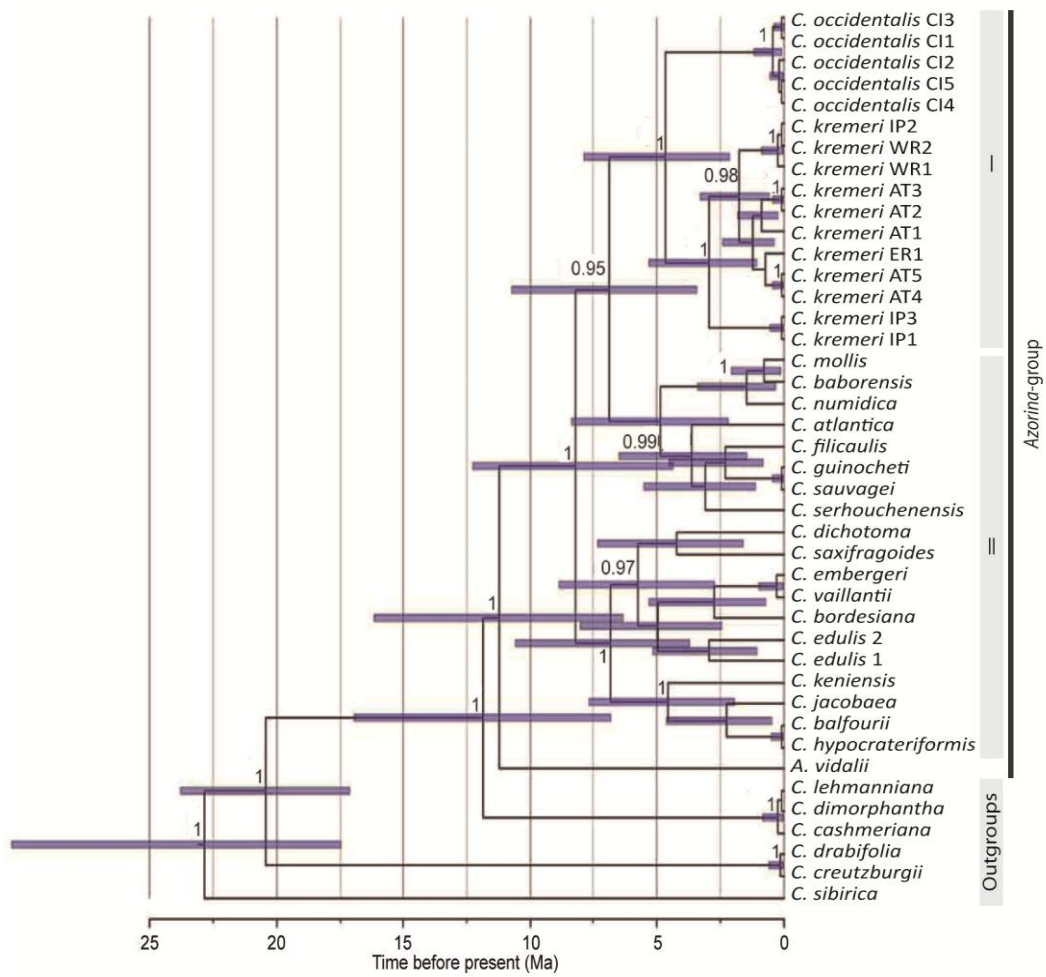


Figure S1. Consensus tree of *Azorina*-group of species. Maximum-clade-credibility time-calibrated tree inferred and dated in BEAST, using a nuclear matrix with ITS and PPR11 concatenated. The numbers above branches are posterior probabilities and blue bars represent the posterior distribution of divergence-time estimates. We used GTR model and ITS and PPR11 were treated as two separate partitions, with the substitution and clock models unlinked and Birth-Death prior as speciation model.

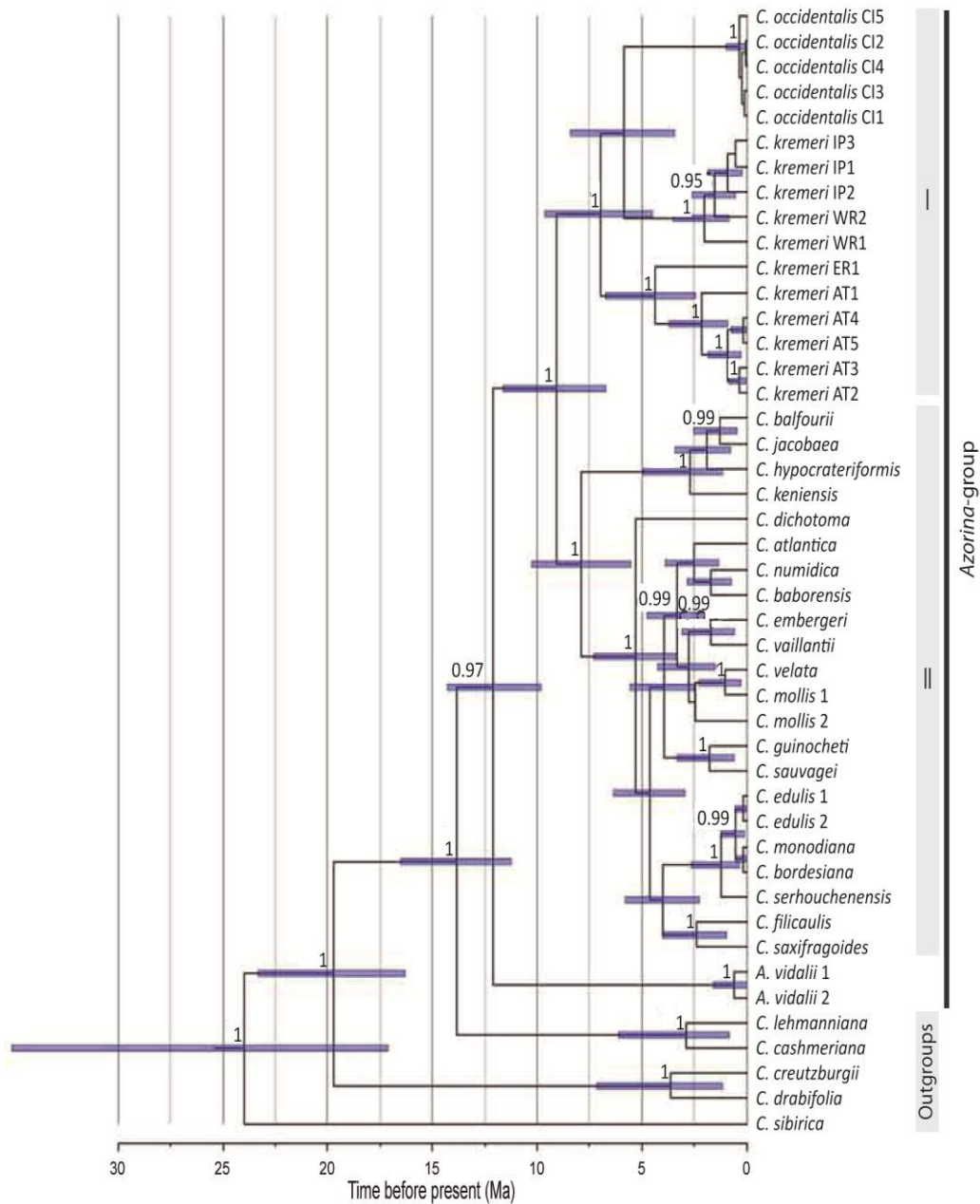


Figure S2. Consensus tree of *Azorina*-group of species. Maximum-clade-credibility time-calibrated tree inferred and dated in BEAST, using a plastid matrix with *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *petB-petD* and *rpl32-trnL* concatenated. The numbers above branches are posterior probabilities and blue bars represent the posterior distribution of divergence-time estimates. We used GTR + Γ model and the four markers were treated as the same partition, with Birth-Death prior as speciation model.

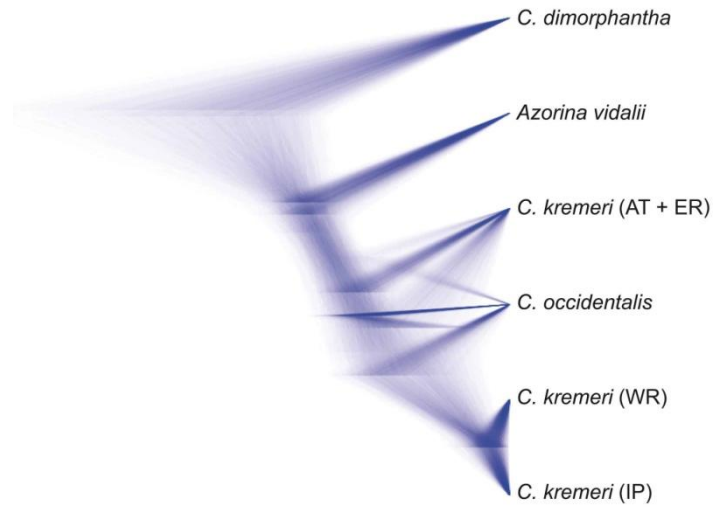


Figure S3. Densitree plot displaying a subsample of the Markov chain Monte Carlo of 10,000 maximum clade credibility trees based on plastid and nuclear data.

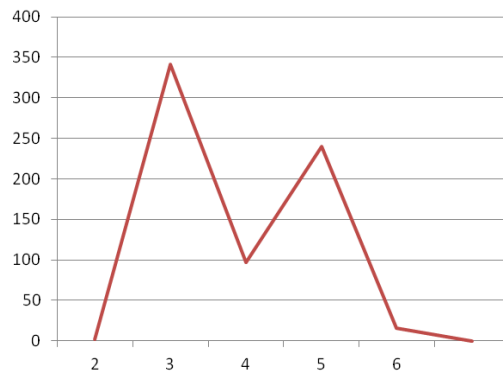


Figure S4. Second-order rate of change of the likelihood function with respect to K. Maximum ΔK values correspond to the presumed true number of K clusters.

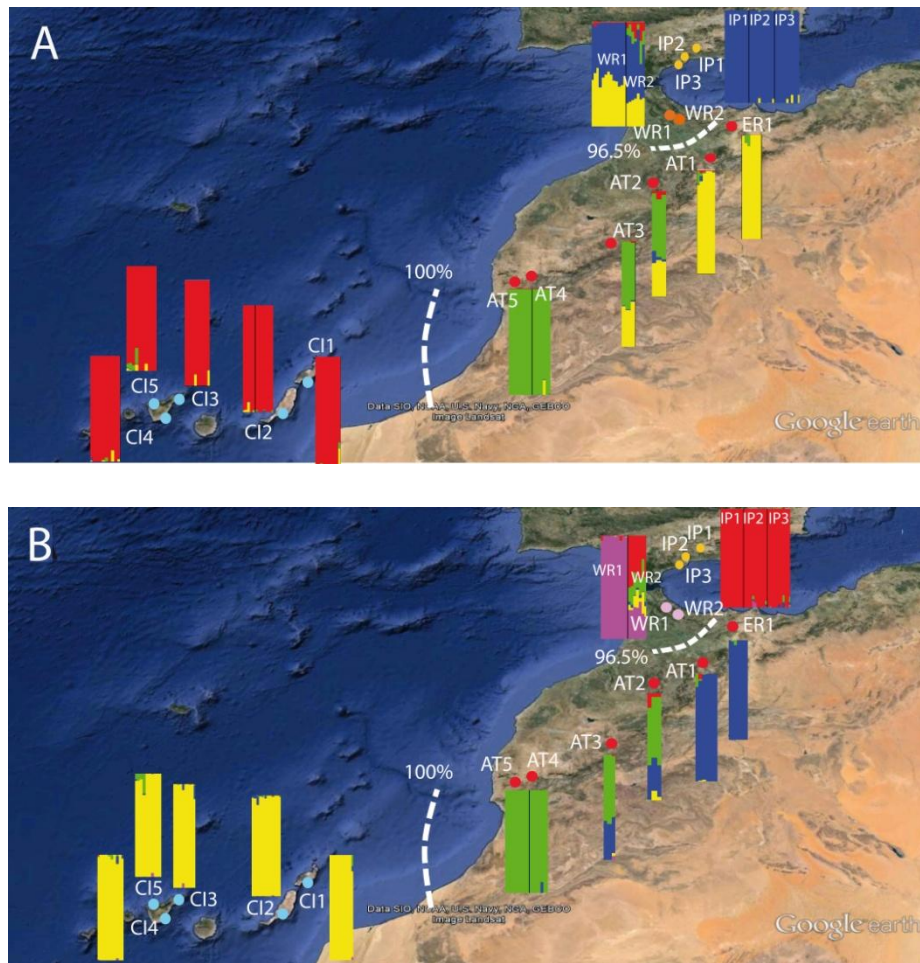


Figure S5. Results from the analysis of AFLP markers using (A) $K=4$ and (B) $K=5$. Histograms show the Bayesian clustering of individuals within populations (STRUCTURE); colours represent the proportion of individual membership to each inferred Bayesian group. Dotted lines indicate barriers to gene flow and their percentage, as inferred by BARRIER and populations are named with population code (Table 1).

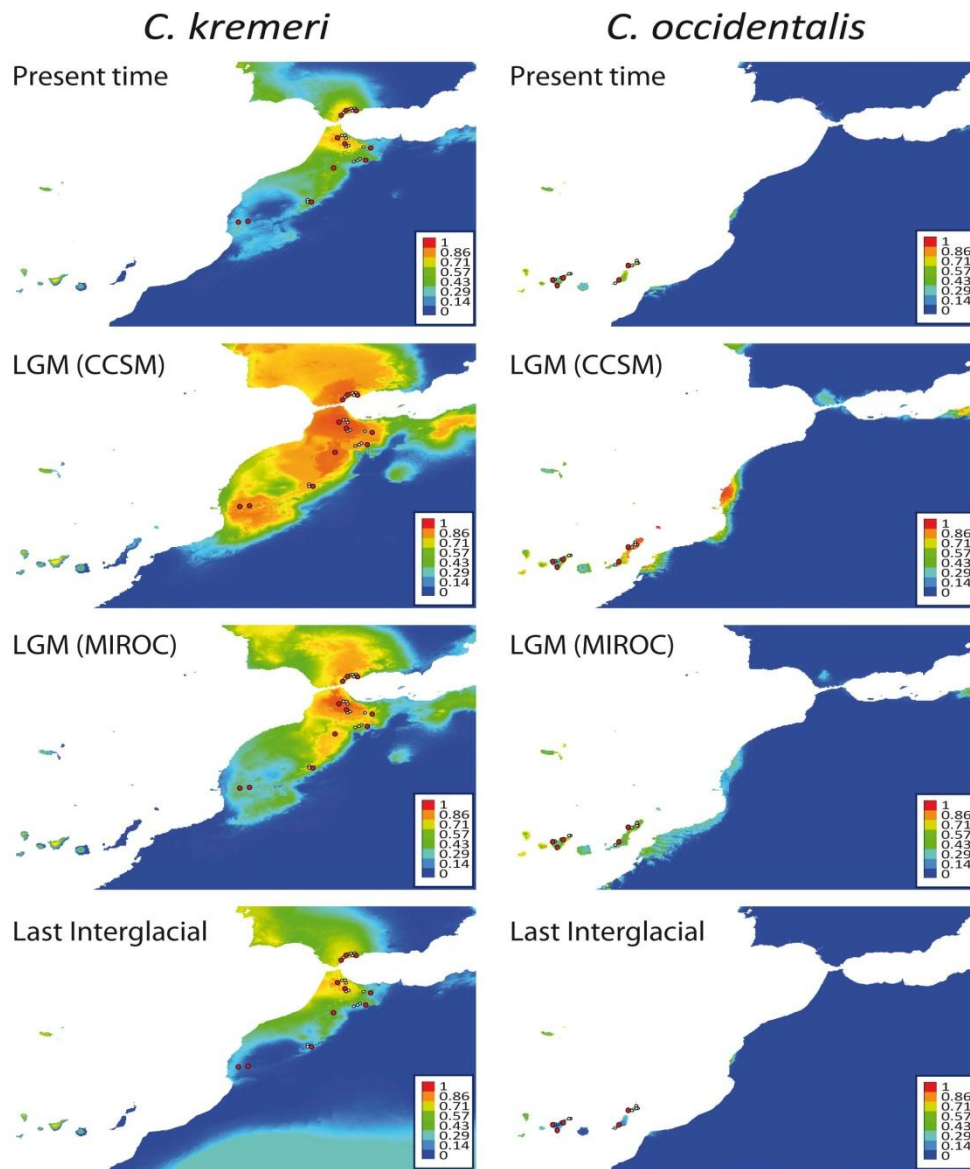


Figure S6. Species distribution of *C. kremeri* (left) and *C. occidentalis* (right) analysed separately, as inferred by Maxent. The average distribution model under current, Last Glacial Maximum (CCSM, and MIROC) and Last Interglacial climatic conditions are shown.

SÍNTESI I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

Síntesi i discussió dels resultats

En aquesta secció es presenten, sintetitzats, els resultats més destacats d'aquesta tesi, així com la seva discussió.

1. Filogènia molecular i reconstrucció biogeogràfica de les geraniàcies

La reconstrucció filogenètica de les geraniàcies obtinguda en aquesta tesi doctoral ha aportat novetats rellevants en comparació amb altres treballs filogenètics de la família (Fiz *et al.*, 2008; Sytsma *et al.*, 2014). L'arbre filogenètic d'aquest treball inclou un nombre considerablement més alt d'espècies que els estudis previs. Les noves anàlisis es basen en la seqüenciació de dos marcadors d'ADN cloroplàstic, *rbcL^{1F}-rbcL^{724R}*, i *trnL^{UAA}-trnF^{GAA}* (amb els encebadors *trnC* i *trnF*; Taberlet *et al.*, 1991), i la regió de l'ADN nuclear ribosòmic ITS. Es van escollir aquests marcadors per la seva variabilitat i per la quantitat elevada de seqüències disponibles a *GenBank*. En total, es van analitzar 368 espècies de geraniàcies representant els cinc gèneres de la família: una espècie del gènere monotípic *California*, 62 d'*Erodium*, 111 de *Geranium*, 32 de *Monsonia* i 162 de *Pelargonium*, més dues espècies de la família germana *Hypseocharitaceae* com a grup extern.

En l'arbre filogenètic de les geraniàcies s'observa que tots els gèneres són monofilètics amb suport estadístic als seus nodes. El gènere que va divergir primer és *Pelargonium*, fet que ja van apuntar Price i Palmer (1993). D'acord amb la nostra datació i reconstrucció biogeogràfica, aquesta divergència es va produir a l'eocè (c. 45 Ma) al sud d'Àfrica, on habiten la majoria de les espècies de *Pelargonium*. La reconstrucció filogenètica de *Pelargonium* mostra la separació de dos grans clades en aquest gènere fa 24 Ma (14,8–29,9 Ma), un amb espècies que presenten cromosomes de mida gran i l'altre amb espècies amb cromosomes de mida petita [$<1,5 \mu\text{m}$ de llargada, Gibby i Westfold (1986); Gibby (1990)]. El clade que presenta els tàxons amb cromosomes petits comprèn aproximadament el 80% del total de les c. 270 espècies descrites del gènere.

El gènere *Monsonia* va començar a divergir al sud d'Àfrica, probablement a la zona del desert del Namib i la regió del Cap, durant el miocè inferior (c. 21 Ma). Les dades paleoclimàtiques suggereixen que la desertització d'Àfrica va començar en aquest desert durant el miocè inferior i va progressar cap a l'est i el nord del continent (Senut

et al., 2009; Pokorny *et al.*, 2015). Tot i això, els esdeveniments de desertització més intensos s'han datat a mitjan miocè (10–15 Ma), després de l'establiment del corrent de Benguela. L'aridificació es va accelerar considerablement a Àfrica durant el miocè superior i el pliocè, possiblement com a conseqüència del desplaçament del continent cap al nord (Axelrod, 1975). El canvi progressiu cap a un clima més sec i fred podria haver afavorit l'aparició de plantes tolerants a l'aridesa. L'aparició de *Monsonia* coincideix amb la desertització del continent i probablement els ancestres del gènere es van adaptar a l'aridificació incipient de la regió.

Els ancestres dels gèneres restants (*California*, *Erodium* i *Geranium*), els quals constitueixen el grup corona de les *Geraniaceae*, s'haurien dispersat del sud d'Àfrica a la conca mediterrània, a través dels deserts del Sàhara i Aràbia (Van Zinderen Bakker, 1969). L'extensió de les estepes al final del neogen (Kers, 1968; Venter, 1983) hauria facilitat la dispersió del grup corona de les *Geraniaceae* (Fiz-Palacios *et al.*, 2010). A la base del grup corona es troba el gènere monotípic *California*, el qual va aparèixer fa uns 29 Ma. L'origen geogràfic de *California* no va quedar resolt en la nostra reconstrucció biogeogràfica i postulem dues hipòtesis per explicar la distribució d'aquest gènere a les regions semiàrides del nord-oest d'Amèrica: 1) un desplaçament des de la conca mediterrània cap a Àsia, fins a arribar al nord-oest d'Amèrica per l'estret de Bering (Van Zinderen Bakker, 1969), o 2) una dispersió des del nord d'Àfrica cap a Europa i després cap al nord-est d'Amèrica (Lavin *et al.*, 2000). Com que el gènere americà *California* és germà d'*Erodium*, distribuït àmpliament per Àsia, sembla més plausible la primera hipòtesi, similar a la que es va proposar per a les famílies *Zygophyllaceae* (Beier *et al.*, 2004) i *Plantaginaceae* (Meyers i Liston, 2008). La disjunció geogràfica entre Amèrica del Nord (*California*) i Àsia (*Erodium*) es podria explicar pel trencament del pont terrestre de Bering fa uns 20 Ma aproximadament. D'acord amb les nostres dades biogeogràfiques, la diversificació dels gèneres *Erodium* i *Geranium* hauria tingut lloc a la conca mediterrània, començant a mitjan miocè i acabant al pliocè.

2. Diversificació de les geraniàcies, colonització i adaptació a diferents biomes: d'Àfrica a la resta del món

Les anàlisis de diversificació de les geraniàcies apunten a una augment en la taxa de diversificació del gènere *Pelargonium* durant el miocè en les seccions *Cortusina*,

Hoarea, *Ligularia*, *Otidia*, *Pelargonium*, *Peristera* i *Polyactium*. Les espècies pertanyents a aquestes seccions estan confinades a la regió de pluges d'hivern de l'oest de la regió del Cap (Bakker *et al.*, 2000) i presenten la major diversitat morfològica del gènere. En aquestes seccions es troben tant arbustos llenyosos, com plantes suculentes, geòfits i herbes anuals (Bakker *et al.*, 2004). L'extraordinària i especialitzada diversitat floral de *Pelargonium* sembla clau per entendre la ràpida diversificació del gènere. L'evolució floral està probablement lligada als pol·linitzadors de la regió, els quals són capaços d'extreure el nèctar de diferents tipus de nectari (Blank, 2014). Les espècies de *Pelargonium* són pol·linitzades de manera efectiva per animals de llengua llarga, ja que els nectaris són molt allargats. Aquest estat del caràcter podria haver aparegut als ancestres del gènere, tot i que alguns autors suggereixen que el sistema de pol·linització ancestral de *Pelargonium* hauria estat per mosques o abelles de llengua curta, i que la pol·linització per animals de llengua llarga seria un caràcter derivat (Bakker *et al.*, 2005). La presència de tubercles en la secció *Hoarea* podria haver afavorit també la radiació del grup. La combinació de tots aquests factors morfològics podria explicar la diversificació del gènere (Bakker *et al.*, 2004; Röschenbleck *et al.*, 2014). Tot i el nombre elevat d'espècies de *Pelargonium*, s'han detectat pocs esdeveniments de dispersió o vicariància dins del gènere. La dispersió a llarga distància més destacada va ser des de la regió del Cap a Austràlia. La baixa capacitat de dispersió podria estar relacionada amb la complexitat topogràfica de la regió florística del Cap, la dependència dels pol·linitzadors especialitzats i típics d'aquesta àrea, i la presència del gènere des del seu origen en aquesta zona, que hauria permès l'adaptació a les condicions climàtiques particulars de la regió i l'ocupació de diferents nínxols ecològics.

El gènere *Monsonia* presenta, a l'igual que *Pelargonium*, una elevada diversitat morfològica, tot i que la seva diversificació ha estat considerablement menor. La majoria de les espècies d'ambdós gèneres són tolerants a l'aridesa, i la suculència de tiges i fulles hauria aparegut independentment en els dos gèneres, com a mínim, en dues ocasions: a la secció *Subsucculentia* de *Pelargonium* (Bakker *et al.*, 2004) i al subgènere *Sarcocaulon* de *Monsonia* (Touloumenidou *et al.*, 2007). Aquesta evolució del tipus d'hàbit, tan característica d'ambients secs, hauria afavorit una diversificació regional al desert del Namib a *Monsonia*. Les espècies de *Monsonia* es distribueixen per les principals zones àrides del continent africà, és a dir, pel deserts del Namib i del Sàhara. Emperò, també

habiten hàbitats més humits com la regió del Cap i les muntanyes del Drakensberg al sud-est d'Àfrica. A excepció del subgènere *Sarcocaulon*, totes les altres espècies són herbàcies i majoritàriament perennes. Només hi ha tres espècies anuals i són les que presenten àrees de distribució més extenses, suggerint que aquest tipus de cicle vital hauria afavorit la colonització de diferents ambients. Totes les espècies que habiten zones desèrtiques presenten fruits anemocors, mentre que les espècies distribuïdes per prats o sabanes produeixen fruits tripanocàrpics. Per tant, el tipus de fruit és un caràcter convergent en *Monsonia*, ja que hauria evolucionat independentment en diferents llinatges per facilitar l'establiment en diferents condicions ambientals.

Com ja s'ha comentat anteriorment, el gènere monotípic *California* és endèmic de les regions semiàrides del nord-oest d'Amèrica i presenta una morfologia intermèdia entre els gèneres *Erodium* i *Geranium* (Aldasoro *et al.*, 2002). Les poblacions de *California* podrien haver quedat aïllades climàticament o geogràficament impeding la colonització a altres regions.

El gènere *Erodium* s'hauria adaptat exitosament a la conca mediterrània i, segons la nostra reconstrucció biogeogràfica, hauria colonitzat els altres continents mitjançant dispersions a llarga distància. N'és un exemple el cas d'*Erodium texanum*, espècie endèmica d'Amèrica del Nord, que s'hauria dispersat des de la conca mediterrània fins al continent americà. Dins d'*Erodium* haurien ocorregut, com a mínim, tres colonitzacions independents de les regions semiàrides d'Austràlia, probablement via Àsia i amb origen a la conca mediterrània. Fora de la Mediterrània, la diversificació d'*Erodium* ha estat molt baixa, fet que apunta que les causes de la radiació del gènere estarien lligades a característiques d'aquesta regió. Les radiacions recents d'*Erodium* (fa menys d'1 Ma) coincidirien amb el començament dels períodes glacials. Aquests canvis climàtics podrien haver aïllat les poblacions d'*Erodium* en refugis glacials, promovent l'especiació del gènere i explicant l'elevada diversitat d'espècies i endemismes d'*Erodium*. Un factor que podria haver estat clau en la diversificació d'*Erodium* és l'anualitat. De les cinc regions de clima mediterrani, la conca mediterrània és la que presenta el percentatge més elevat d'espècies anuals (Fiz-Palacios *et al.*, 2010), i aquest tipus de cicle és habitual a *Erodium* (Fiz *et al.*, 2008), sent el gènere de geraniàcies que presenta més espècies anuals. L'autogàmia és el sistema reproductiu dominant en les espècies d'àmplia distribució, suggerint una correlació entre aquest tipus de fecundació i l'habilitat de

colonitzar noves àrees (Fiz *et al.*, 2006). Per últim, el tipus de dispersió dels fruits, principalment per tripanocàrpia, també podria haver afavorit la propagació pels ambients pertorbats típicament mediterranis. En resum, l'adquisició de factors com l'autogàmia, l'annualitat o la dispersió dels fruits, haurien estat clau per a la colonització i l'adaptació a ambients semiàrids.

Finalment, *Geranium* és el gènere de la família en què hem detectat més esdeveniments de colonització per dispersions a llarga distància i tanmateix s'ha adaptat a un ventall d'ambients més ampli en termes d'altitud i latitud. Les nostres dades biogeogràfiques suggereixen la conca mediterrània com l'origen geogràfic del gènere, coincidint amb Fiz *et al.* (2008) i Marcussen i Meseguer (2017). Aquest seria l'origen de la majoria de dispersions de *Geranium* cap a la resta de continents. Diferents llinatges del gènere haurien colonitzat repetidament Amèrica del Sud i Austràlia, recolzant la hipòtesi de dispersions a llarga distància des de l'hemisferi nord al sud, com ja s'ha descrit en la tribu *Ranunculeae* (Emadzade i Hörandl, 2011) o en el gènere *Scleranthus* (Smitsen *et al.*, 2003). Els esdeveniments múltiples de dispersió posen de manifest l'elevada capacitat de les espècies d'*Erodium*, però sobretot de *Geranium*, a l'hora de colonitzar nous ambients. Durant el miocè i pliocè inferior, època de la major diversificació de *Geranium*, el clima mediterrani era més càlid i humit que a l'actualitat, i la regió mediterrània i àrees adjacents estaven cobertes per boscos de fulla perenne i matolls tropicals xeròfils. Les espècies de *Geranium* presenten un tipus de fruit absent en la resta de geraniàcies: mericarpis amb dispersió balística on l'aresta actua com una catapulta que llença les diàspores lluny de la planta mare (Yeo, 1984; Herrera, 1991; Abraham i Elbaum, 2013). Aquest tipus de mericarpi hauria promogut la diversificació de *Geranium* perquè és eficient en ambients humits i de vegetació densa característics de la conca mediterrània durant el miocè i principis del pliocè (Bruch *et al.*, 2011; Pound *et al.*, 2012).

3. Dispersions de la flora àrida africana des del sud: el cas de *Monsonia*

L'escenari de creixent desertització emfatitza la urgència de comprendre com certs llinatges s'han adaptat al llarg de la seva evolució a ambients cada vegada més secs. Com s'ha vist al capítol 2, el gènere *Monsonia* constitueix un cas ideal per estudiar les

relacions biogeogràfiques entre les zones àrides africanes i identificar quins han estat els mecanismes que han facilitat la colonització i adaptació a aquest tipus de bioma.

Avui dia hi ha encara certa controvèrsia a l'hora de definir els límits de la flora àrida i semiàrida africana. Segons Linder (2014), hi ha dos tipus de flora àrida a Àfrica, una distribuïda al sud-oest del continent, a la zona del desert del Namib, i una altra associada a la zona nord-est. Altres autors consideren que les flores àrides del sud-oest i nord-est del continent estarien connectades pel corredor àrid africà (Winterbottom, 1967; Winter, 1971; Pokorny *et al.*, 2015). Aquest corredor va ser definit per Bellstedt *et al.* (2012) com una unió de les flores àrides del sud-oest i nord-est del continent. A més, altres estudis apunten que la flora àrida africana i el patró florístic de la *Rand Flora* no estan clarament diferenciats (Sanmartín *et al.*, 2010; Mairal *et al.*, 2015). La *Rand Flora* és un patró que presenta una distribució disjunta d'espècies al marge del continent africà, concretament a la conca mediterrània, la Macaronèsia i el nord-oest d'Àfrica, el sud de la península d'Aràbia i l'est d'Àfrica, el sud d'Àfrica i, fins i tot, l'oest d'Àsia. Alguns grups de la *Rand Flora* inclouen plantes suculentas adaptades a ambients secs, tot i que no arriben a habitar deserts. Linder (2014) considera la *Rand Flora* com una extensió del corredor àrid africà, mentre que Pokorny *et al.* (2015) diferencien la *Rand Flora* del corredor àrid africà perquè presenta principalment espècies adaptades a ambients subtropicals o semiàrids. En qualsevol cas, l'estudi d'aquests patrons (tant el corredor àrid africà com la *Rand Flora*) pot ser útil per a comprendre millor els processos de distribució d'espècies en regions àrides i semiàrides d'Àfrica.

La reconstrucció biogeogràfica de *Monsonia* suggereix que l'origen del grup va tenir lloc al desert del Namib i la regió del Cap durant el miocè inferior (c. 21 Ma), coincidint amb els processos de desertització del continent (Senut *et al.*, 2009; Pokorny *et al.*, 2015). De les 34 espècies de *Monsonia* analitzades en el nostre treball, 25 es distribueixen a la regió del Cap i del Namib, i 19 són endèmiques d'aquesta àrea. L'aparició de les espècies del Namib al miocè va facilitar que aquestes tinguessin molt temps per adaptar-se a les noves condicions xèriques. Les anàlisis biogeogràfiques assenyalen que hi va haver, com a mínim, tres esdeveniments de dispersió des del sud-oest d'Àfrica a la resta del continent: la primera dispersió va ocórrer fa uns 20 Ma cap al nord d'Àfrica, posteriorment fa 15 Ma un llinatge es va dispersar cap a la regió de l'est

d'Àfrica i, finalment, fa uns 7 Ma es van colonitzar les estepes del sud-est d'Àfrica amb èxit.

A mesura que la desertització avançava del sud-oest cap al nord d'Àfrica, les espècies de *Monsonia* van colonitzar probablement noves regions àrides, així com hàbitats propers més humits, com ara sabanes o estepes, fins arribar a la conca mediterrània (com ja s'ha esmentat en paràgrafs anteriors). Particularment interessant és el cas de *Monsonia senegalensis*, la qual es distribueix per regions subsaharianes i semiàrides de la banya d'Àfrica, ocupant hàbitats típics d'una espècie amb distribució *Rand Flora*. El llinatge de *Monsonia nivea* i *Monsonia heliotropioides* presenta una distribució extensa per tot el nord d'Àfrica fins a la península d'Aràbia i algunes localitats del Pakistan. Aquestes colonitzacions cap al nord i adaptacions a climes menys secs haurien estat afavorides per l'aparició de les muntanyes del Drakensberg al pliocè, les quals haurien actuat com a passeres pels ancestres de *Monsonia*. La migració d'espècies cap al nord a través d'aquestes muntanyes s'ha documentat en diferents grups (Carbutt i Edwards, 2001; Galley *et al.*, 2007).

4. Factors clau que van afavorir la diversificació i colonització de diferents biomes africans

Els llinatges més antics de *Monsonia* presenten taxes baixes de diversificació. Els ancestres d'aquests clades podrien ser plantes herbàcies amb poques adaptacions a l'aridesa. Aquests llinatges haurien quedat aïllats en regions lleugerament menys àrides i van dispersar cap al nord-est probablement pel corredor àrid africà en períodes climàtics favorables. Les nostres anàlisis van detectar un augment de la taxa de diversificació en el llinatge constituït per les espècies suculentes del subgènere *Sarcocaulon* del Namib i les espècies que habiten les muntanyes del Drakensberg. Aquesta acceleració de la diversificació no es va detectar en l'anàlisi de diversificació global per a totes les geraniàcies, probablement per la mida moderada de *Monsonia* en comparació amb altres gèneres de la família.

La reconstrucció ancestral del nínxol ecològic suggereix que la separació del clade de suculentes del d'espècies del Drakensberg és el resultat d'un esdeveniment de divergència ecològica relativament recent. El clade de les espècies suculentes s'hauria adaptat a les condicions hiperàrides del Namib, gràcies a una combinació de caràcters

com la suculència de tiges i fulles i el tipus de fruit. Les anàlisis de modelització de nínxol mostren que moltes de les espècies del subgènere *Sarcocaulon* estan confinades en regions de la costa del Namib on les boires són freqüents. El solapament de nínxol ecològic en aquest llinatge és baix, i en cap cas n'hem detectat entre espècies germanes, indicant que no hi ha una forta conservació del nínxol en aquest grup i que la divergència ecològica ha tingut un paper rellevant en la seva diversificació.

Algunes espècies del clade *Sarcocaulon* (p. ex. *M. flavescens*, *M. mossamedensis*, *M. multifida*) presenten un nínxol ecològic molt reduït, altament especialitzat en el clima hiperàrid; aquestes espècies depenen fortament de la humitat de les boires generades pel corrent de Benguela (Siesser, 1980). La diferència de temperatura de l'aigua del mar i del continent desplaça les boires terra endins, cap a punts de baixa pressió, i l'aigua es condensa en roquissars o vessants de les muntanyes, on es concentra una gran diversitat vegetal (Olivier, 1995; Bruyns, 2000; Ellis *et al.*, 2006; Burke, 2013; Valente i Vargas, 2013; Bruyns *et al.*, 2014; Young i Desmet, 2016). En aquests hàbitats tan restringits també s'ha documentat la presència d'espècies de *Pelargonium* (Martínez-Cabrera *et al.*, 2012).

Les nostres dades d'evolució de nínxol ecològic i tipus de fruit semblen indicar que hi hauria una correlació entre ambdós caràcters. Independentment de la posició filogenètica, les espècies que habiten regions àrides presenten fruits anemocors, essent aquest tipus de dispersió un caràcter convergent a *Monsonia*. En canvi, els tàxons d'àrees semiàrides o pertorbades exhibeixen fruits tripanocàrpics. Aquest últim tipus de fruit hauria afavorit la diversificació del clade de les espècies del Drakensberg. Aquesta correlació entre el tipus de fruit i l'aridesa també es pot deduir en el gènere *Pelargonium*, com hem vist anteriorment. Els nostres resultats també suggereixen una correlació entre l'amplitud de nínxol i l'aridesa: les espècies que habiten ambients àrids presenten àrees de distribució més petites que les que viuen en ambients semiàrids.

El metabolisme CAM és comú entre les espècies crasses adaptades a ambients àrids (Arakaki *et al.*, 2011). Per tant, el tipus de metabolisme esperat per les espècies suculentas del Namib seria CAM, però l'estudi metabòlic va resultar en valors indicatius de sistemes fotosintètics C₃ per a totes les espècies analitzades. Aquests resultats també s'han reportat en altres famílies de plantes com *Crassulaceae* i *Aizoaceae* (Ripley *et al.*, 2013). En aquests estudis, els autors suggereixen que les espècies del Namib

presentarien habitualment metabolisme C_3 , però que podrien assimilar eventualment el carboni per la via CAM en el cas que les condicions ambientals esdevinguessin extremadament àrides.

5. El rol del nord d'Àfrica com a font i refugi de diversitat vegetal

Així com la complexitat geogràfica i climàtica del sud d'Àfrica va afavorir la diversificació i dispersió dels gèneres *Pelargonium* i *Monsonia*, les muntanyes del nord d'Àfrica (tals com les serralades de l'Atlas i el Rif) van actuar com a reservori i font de llinatges de plantes africanes. Per analitzar en profunditat el paper que va jugar aquesta regió com a centre de biodiversitat, vam focalitzar-nos en el grup *Azorina* de les campanetes africanes, pertanyent a les campanulàcies, el qual presenta disjuncions geogràfiques interessants. Segons la nostra reconstrucció filogenètica, el grup *Azorina* s'hauria originat al miocè superior (8,7–13,3 Ma), probablement a la zona oest d'Àsia i des d'allà s'hauria dispersat cap al nord d'Àfrica. Aquests resultats coincideixen amb estudis anteriors (Roquet *et al.*, 2009; Alarcón *et al.*, 2013). El grup de campanetes africanes s'hauria adaptat a les condicions àrides del nord d'Àfrica durant aquest període (Zhang *et al.*, 2014). La majoria d'espècies del grup *Azorina* presenta característiques que probablement hagin facilitat la seva aclimatació a biomes àrids, com ja s'ha vist en diferents gèneres de geraniàcies. L'annualitat i la fàcil dispersió dels seus fruits hauria estat clau per a l'adaptació d'aquestes espècies al nord d'Àfrica i àrees adjacents.

Les anàlisis biogeogràfiques indiquen que es van produir diferents esdeveniments de dispersió des del nord d'Àfrica cap a àrees més o menys properes com les penínsules del sud d'Europa, la Macaronèsia, Àfrica central, l'est d'Àfrica i la península d'Aràbia. Aquest patró de migracions des del nord d'Àfrica a zones adjacents s'ha descrit en altres plantes (Valtueña *et al.*, 2016) i en animals (Husemann *et al.*, 2014). La combinació de dos factors clau podrien explicar l'elevada biodiversitat del nord d'Àfrica. Per una banda, l'heterogeneïtat topogràfica de la regió hauria facilitat l'aïllament genètic de les poblacions per al·lopatria, i per altra banda, les contraccions i expansions de les àrees de distribució de les espècies per l'efecte climàtic de les glaciacions del plistocè haurien permès el contacte de les poblacions durant períodes climàticament favorables.

Les nostres anàlisis biogeogràfiques ens van permetre descriure dos corredors de dispersió principals que haurien afavorit les dispersions de les campanetes del grup *Azorina* per Àfrica. Un corredor hauria connectat els massissos de l'est i l'oest del Magrib, i l'altre el nord-oest d'Àfrica amb l'est d'Àfrica i la península d'Aràbia. La presència del primer corredor dataria de fa 2,8–3,2 Ma, després de l'establiment de les condicions climàtiques mediterrànies del nord d'Àfrica i d'una accentuació de la desertització de la zona. És probable que des d'aquests massissos es colonitzessin les illes macaronèsiques i les del sud d'Europa per l'acció del vent que hauria transportat les llavors de mida petita d'aquestes campanetes. Actualment, moltes de les espècies del grup *Azorina* es distribueixen en regions aïllades i hàbitats rupícoles, com ara penya-segats de pedra calcària. Les barreres ecològiques o geogràfiques podrien haver afavorit l'especiació per al·lopatría en el grup *Azorina*. El segon corredor abasta una àrea molt més extensa que comprèn des del nord-oest d'Àfrica fins a l'est d'Àfrica i la península d'Aràbia. Les muntanyes saharianes d'aquesta regió, com l'Atlas, el Hoggar, el Rif o el Tibesti, podrien haver actuat com a passeres pels ancestres del grup *Azorina*, però també podrien haver servit com a refugis glacials durant períodes climàticament adversos.

Les connexions biogeogràfiques entre el nord d'Àfrica, el sud de la península Ibèrica i les illes Canàries es van analitzar prenent com cas d'estudi el llinatge format per *Campanula kremeri*, distribuïda pel nord d'Àfrica i el sud de la península Ibèrica, i *Campanula occidentalis*, endèmica de les illes Canàries. L'ancestre d'aquest llinatge va aparèixer fa 6,9 Ma (4,96–9,51) probablement al nord-oest d'Àfrica i des d'allà s'hauria dispersat a la península Ibèrica i la Macaronèsia. Els nostres resultats mostren que els nivells més alts de diversitat genètica són presents a les poblacions de *C. kremeri* de l'Atlas i el Rif, contrastant amb la sorprenentment baixa diversitat de les poblacions de *C. occidentalis* de Canàries, on es va trobar el mateix haplotip cloroplàstic en tots els individus. Per a les poblacions de la península Ibèrica es van descriure dos haplotips cloroplàstics, un d'ells compartit amb les poblacions de *C. kremeri* de l'oest de Rif. Els resultats dels AFLPs remarquen també la relació entre les muntanyes de l'oest de Rif i la península Ibèrica, suggerint una possible connexió entre ambdues regions a través de l'estret de Gibraltar. Aquesta connexió podria haver estat relativament recent i com a resultat de les oscil·lacions climàtiques del plistocè, període durant el qual el nivell de la mar Mediterrània baixava fins a 150 metres (Lambeck *et al.*, 2002) i els vents de llevant

eren recurrents (Dorman *et al.*, 1995). La combinació de tots aquests factors hauria afavorit la dispersió de les llavors de *C. kremeri* a banda i banda de l'estret de Gibraltar. Per tant, en el nostre cas d'estudi, l'estret de Gibraltar va resultar una barrera geogràfica permeable al flux gènic, com ja s'havia descrit en diferents grups (García-Mudarra *et al.*, 2009; Guzmán i Vargas, 2009). Tot i això, l'estret de Gibraltar hauria impedit el flux gènic en altres grups de plantes (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2008).

L'elevat nombre de fragments privats obtinguts en les anàlisis dels AFLPs i l'elevada diversitat haplotídica trobats a les poblacions de l'Atlas i el Rif suggereixen que aquestes serralades van actuar com a refugi durant períodes climàtics desfavorables. Moltes espècies haurien migrat a zones més elevades de l'Atlas i el Rif quan les condicions climàtiques eren adverses. El model de distribució de les poblacions del nord d'Àfrica prediu que durant els períodes interglacials hi va haver una reducció de l'àrea de distribució potencial de *C. kremeri*, tot i que aquesta contracció no va afectar l'Atlas i el Rif, confirmant el paper d'aquestes regions com a refugis. El patró d'expansió i contracció de l'àrea de distribució durant els cicles glacials i interglacials del plistocè s'ha emprat per explicar la conservació de la diversitat genètica de tàxons distribuïts pel nord d'Àfrica (Médail i Diadema, 2009; Husemann *et al.*, 2014). A més, aquesta explicació estaria en consonància amb la hipòtesi de "refugis dins de refugis" proposada per Gómez i Lunt (2007) que postula que hi ha regions que haurien actuat com refugi i dins d'aquestes, altres àrees que concentrarien nivells de diversitat extraordinàriament elevats.

Els marcadors nuclears i cloroplàstics van aportar dues topologies diferents pel llinatge de *C. kremeri* i *C. occidentalis*. El senyal nuclear indica una divergència clara entre les dues espècies, de tal manera que les poblacions de *C. occidentalis* constitueixen un grup monofilètic, germà de tot el grup de poblacions de *C. kremeri*. En canvi, les dades cloroplàstiques suggereixen que només les poblacions de l'oest del Rif i de la península Ibèrica de *C. kremeri* serien germanes de les poblacions canàries. Els resultats dels AFLPs mostren una possible reticulació entre les poblacions de *C. kremeri* de l'Atlas i l'est del Rif amb les de l'oest del Rif. Aquesta reticulació indicaria l'existència, en el passat, de flux gènic entre les poblacions dels sistemes muntanyosos del nord-oest d'Àfrica, afavorint l'augment de la diversitat genètica de les poblacions. A més, aquesta

elevada variabilitat genètica hauria pogut suavitzar els efectes negatius dels possibles colls d'ampolla produïts durant les èpoques de condicions climàtiques desfavorables.

6. Del continent a les illes: colonització de la Macaronèsia des d'Àfrica

Segons les nostres anàlisis de datació amb dades nuclears, els ancestres de *C. kremeri* i *C. occidentalis* haurien divergit fa 3,7 Ma (2,3–7,4). Aquesta separació relativament antiga contrasta amb els valors baixos de diversitat genètica detectats en *C. occidentalis*. A més, aquesta baixa variabilitat genètica de l'espècie canària (en comparació amb els valors de les poblacions de *C. kremeri* del nord d'Àfrica) contrasta amb els resultats obtinguts en altres estudis comparatius, en els quals es detecta una major diversitat genètica a la Macaronèsia que al continent (García-Verdugo *et al.*, 2015). Una possible explicació per a nivells pobres de diversitat a les illes seria la baixa capacitat de dispersió i cicles de vida llargs (Stuessy *et al.*, 2014). Per contra, tant *C. kremeri* com *C. occidentalis* són anuals, autògames i presenten llavors molt petites fàcilment dispersades pel vent. Per tant, la nostra hipòtesi per explicar aquests nivells depauperats de diversitat, proposada també per Mairal *et al.* (2015), és que els ancestres de *C. occidentalis* haurien restat confinats en regions aïllades de la costa atlàntica del Magrib amb clima macaronèsic (Médail i Diadema, 2009), i haurien dispersat recentment a les illes. Aquests ancestres es podrien haver extingit (Mairal *et al.*, 2015) o podrien romandre encara en localitats desconegudes de la costa atlàntica. Una altra hipòtesi plausible seria que les poblacions canàries haguessin patit un coll d'ampolla, però descartem aquesta possibilitat per les característiques morfològiques i reproductives de *C. occidentalis*, les quals haurien permès una recuperació i acumulació de variabilitat genètica a les diferents illes (Stuessy *et al.*, 2014).

A part de *C. occidentalis*, dins del grup *Azorina* hi ha dues espècies més distribuïdes per la Macaronèsia: *Azorina vidalii* endèmica de les Açores, i *Campanula jacobaea*, endèmica de Cap Verd. La història biogeogràfica d'*A. vidalii* encara és confusa. Segons la nostra reconstrucció biogeogràfica, els ancestres d'*A. vidalii* s'haurien dispersat des de l'oest d'Àsia cap a Àfrica i, des del continent africà, haurien colonitzat les Açores, on haurien quedat aïllats. La divergència d'*A. vidalii* s'hauria produït fa 8,2 Ma (7,52–12,46), temps suficient perquè hagin ocorregut diferents processos d'extinció i especiació en aquest llinatge. Les condicions climàtiques peculiars de les Açores podrien

haver afavorit l'aparició d'unes característiques morfològiques i reproductives úniques en comparació amb la resta d'espècies del grup de campanetes africanes.

La reconstrucció biogeogràfica de *Campanula jacobaea* indica una història evolutiva diferent. Com s'ha vist al capítol 3, *Campanula jacobaea* pertany a un grup de campanetes distribuïdes pel continent africà. L'ancestre d'aquesta espècie va divergir de la seva germana, *C. balfourii*, fa relativament poc temps (c. 1,7 Ma). Ambdues espècies, *C. balfourii* i *C. jacobaea*, són germanes de *C. hypocrateriformis*, una espècie anual que habita regions del nord-oest d'Àfrica amb clima macaronèsic (Dobignard, 2002). És possible que l'ancestre de *C. hypocrateriformis* estigués distribuït per tot el nord d'Àfrica, i que durant els períodes climàtics favorables del plistocè, s'expandís arribant a zones costeres prop de Cap Verd, mentre que durant les èpoques climàtiques adverses les poblacions es fragmentessin (Alarcón *et al.*, 2013). Els ancestres de *C. jacobaea* que van quedar al continent, a l'igual que els de *C. occidentalis*, es podrien haver extingit degut a les condicions més àrides d'aquesta regió (Alarcón *et al.*, 2013), o bé podrien romandre confinades en localitats molt restringides de la costa atlàntica on encara perdurarien les condicions climàtiques macaronèsiques.

Referències bibliogràfiques

- Alarcón, M., Roquet, C., García-Fernández, A., Vargas, P. & Aldasoro, J. J. (2013) Phylogenetic and phylogeographic evidence for a Pleistocene disjunction between *Campanula jacobaea* (Cape Verde Islands) and *C. balfourii* (Socotra). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, 828–836.
- Abraham, Y. & Elbaum, R. (2013) Hygroscopic movements in Geraniaceae: the structural variations that are responsible for coiling or bending. *New Phytologist*, **199**, 584–594.
- Aldasoro, J. J., Navarro, C., Vargas, P., Sáez, L. & Aedo, C. (2002) *California*, a new genus of Geraniaceae endemic to the southwest of North America. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **59**, 209–216.

- Arakaki, M. *et al.* (2011) Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 8379–8384.
- Axelrod, D. I. (1975) Evolution and biogeography of Madrean-Tethyan sclerophyll vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **62**, 280–334.
- Bakker, F. T., Culham, A., Pankhurst, C. E. & Gibby, M. (2000) Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany*, **87**, 727–734.
- Bakker, F. T., Culham, A., de Marais, A. B. & Gibby, M. (2005). Nested radiation in Cape *Pelargonium*. In F.T. Bakker (Ed.). *Plant species-level systematics: new perspectives on pattern & process* (pp. 75-100). A.R.G. Gantner Verlag: Liechtenstein.
- Bakker, F. T., Culham, A., de Marais, A. B. & Gibby, M. (2005) Nested radiation in Cape *Pelargonium*. *Plant Species-level Systematics: New Perspectives on Pattern & Process*, **143**, 75–100.
- Beier, B. A., Nylander, J. A. A., Chase, M. W. & Thulin, M. (2004) Phylogenetic relationships and biogeography of the desert plant genus *Fagonia* (Zygophyllaceae), inferred by parsimony and Bayesian model averaging. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**, 91–108.
- Bellstedt, D. U., Galley, C., Pirie, M. D. & Linder, H. P. (2012) The migration of the palaeotropical arid flora: Zygophylloideae as an example. *Systematic Botany*, **37**, 951–959.
- Ben Faleh *et al.* (2012) Phylogeography of the Greater Egyptian Jerboa (*Jaculus orientalis*) (Rodentia: Dipodidae) in Mediterranean North Africa. *Journal of Zoology*, **286**, 208–220.
- Blank, E. M. (2014) *Pelargonium* (Geraniaceae) and the long-tongued fly pollination guild: coevolution and polymorphism in a specialized pollination system. *University of Connecticut*, PhD thesis.

- Bruch, A. A., Utescher, T. & Mosbrugger, V. (2011) Precipitation patterns in the Miocene of Central Europe and the development of continentality. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **304**, 202–211.
- Bruyns, P. V. (2000) Phylogeny and Biogeography of the Stapeliads. *Plant Systematics and Evolution*, **221**, 199–226.
- Bruyns, P. V., Oliveira-Neto, M., Melo-de-Pinna, G. F. & Klak, C. (2014). Phylogenetic relationships in the Didiereaceae with special reference to subfamily Portulacarioideae. *Taxon*, **63**, 1053–1064.
- Burke, A. (2013) Succulent plants on arid inselbergs. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **208**, 321–329.
- Carbutt, C. & Edwards, T. (2001) Cape elements on high-altitude corridors and edaphic islands: historical aspects and preliminary phytogeography. *Systematics and Geography of Plants*, **71**, 1033–1061.
- De Menocal, P.B. (2004) African climate change and faunal evolution during the Pliocene-Pleistocene. *Earth and Planetary Science Letters*, **220**, 3–24.
- Dobignard, A. (2002) Contributions a la connaissance de la flore du Maroc et de l’Afrique du Nord. Nouvelle serie: 1. *Journal de Botanique de la Société Botanique de France*, **20**, 5–43.
- Dorman, C.E., Beardsley, R.C. & Limeburner, R. (1995) Winds in the Strait of Gibraltar. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, **121**, 1903–1922.
- Ellis, A. G., Weis, A. E. & Brandon, S. G. (2006) Evolutionary radiation of ‘stone plants’ in the genus *Argyroderma* (Aizoaceae): unraveling the effects of landscape, habitat, and flowering time. *Evolution*. **60**, 39–55.
- Emadzade, K. & Hörandl, E. (2011) Northern Hemisphere origin, transoceanic dispersal, and diversification of *Ranunculeae* DC.(Ranunculaceae) in the Cenozoic. *Journal of Biogeography*, **38**, 517–530.

- Fiz, O., Vargas, P., Alarcón, M. L. & Aldasoro, J. J. (2006) Phylogenetic relationships and evolution in *Erodium* (Geraniaceae) based on trnL-trnF sequences. *Systematic Botany*, **31**, 739–763.
- Fiz, O. *et al.* (2008) Phylogeny and historical biogeography of Geraniaceae in relation to climate changes and pollination ecology. *Systematic Botany*, **33**, 326–342.
- Fiz-Palacios, O., Vargas, P., Vila, R., Papadopulos, A. S. & Aldasoro, J. J. (2010) The uneven phylogeny and biogeography of *Erodium* (Geraniaceae): radiations in the Mediterranean and recent recurrent intercontinental colonization. *Annals of Botany*, **106**, 871–884.
- Galley, C., Bytebier, B., Bellstedt, D. U. & Linder, H. P. (2007) The Cape element in the Afrotropical flora: from Cape to Cairo?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **274**, 535–543.
- García-Mudarra, J. L., Ibáñez, C., & Juste, J. (2009) The Straits of Gibraltar: barrier or bridge to Ibero-Moroccan bat diversity? *Biological Journal of the Linnean Society*, **96**, 434–450.
- García-Verdugo, C. *et al.* (2015) Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. *Molecular Ecology*, **24**, 726–741.
- Gibby, M. & Westfold, J. (1986) A cytological study of *Pelargonium* sect. *Eumorpha* (Geraniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **153**, 205–222.
- Gibby, M. (1990) Cytological and morphological variation within *Pelargonium alchemilloides* s.l. (Geraniaceae). *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg*, **14**, 707–722.
- Gómez, A. & Lunt, D. H. (2007) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. *Phylogeography of Southern European Refugia* (pp. 155–188). Amsterdam: Springer.

- Guzmán, B. & Vargas, P. (2009) Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography*, **36**, 954–968.
- Herrera, J. (1991) Herbivory, seed dispersal, and the distribution of a ruderal plant living in a natural habitat. *Oikos*, **62**, 209–215.
- Husemann, M., Schmitt, T., Zachos, F. E., Ulrich, W. & Habel, J. C. (2014) Palaeartic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaeartic biota. *Journal of Biogeography*, **41**, 81–94.
- Kers, L. E. (1968) Contributions towards a revision of *Monsonia* (Geraniaceae). *Botaniska Notiser*, **121**, 44.
- Lambeck, K., Yokoyama, Y. & Purcell, T. (2002) Into and out of the Last Glacial Maximum: sea-level change during oxygen isotope stages 3 and 2. *Quaternary Science Reviews*, **21**, 343–360.
- Lavin, M., Thulin, M., Labat, J. N. & Pennington, R. T. (2000) Africa, the odd man out: molecular biogeography of dalbergioid legumes (Fabaceae) suggests otherwise. *Systematic Botany*, **25**, 449–467.
- Linder, H. P. (2014) The evolution of African plant diversity. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **2**, 38.
- Mairal, M., Pokorny, L., Aldasoro, J. J., Alarcón, M. & Sanmartín, I. (2015) Ancient vicariance and climate-driven extinction explain continental-wide disjunctions in Africa: the case of the Rand Flora genus *Canarina* (Campanulaceae). *Molecular Ecology*, **24**, 1335–1354.
- Marcussen, T. & Meseguer, A. S. (2017) Species-level phylogeny, fruit evolution and diversification history of *Geranium* (Geraniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **110**, 134–149.
- Martínez-Cabrera, H. I., Schlichting, C. D., Silander, J. A. & Jones, C. S. Low levels of climate niche conservatism may explain clade diversity patterns in the South African

- genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany*, **99**, 954–960 (2012).
- Médail, F. & Diadema, K. (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **36**, 1333–1345.
- Meyers, S. C. & Liston, A. (2008) The biogeography of *Plantago ovata* forssk. (Plantaginaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 954–962.
- Naciri, Y., Cavat, F. & Jeanmonod, D. (2010) *Silene patula* (Siphonomorpha, Caryophyllaceae) in North Africa: a test of colonisation routes using chloroplast markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 922–932.
- Olivier, J. (1995) Spatial distribution of fog in the Namib. *Journal of Arid Environments* **29**, 129–138.
- Pokorny, L. (2015) Living on the edge: timing of Rand Flora disjunctions congruent with ongoing aridification in Africa. *Frontiers in Genetics*, **6**, 154.
- Pound, M. J., Haywood, A. M., Salzmann, U. & Riding, J. B. (2012) Global vegetation dynamics and latitudinal temperature gradients during the Mid to Late Miocene (15.97–5.33 Ma). *Earth-Science Reviews*, **112**, 1–22.
- Price, R. A. & Palmer, J. D. (1993) Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geraniales from rbcL sequence comparisons. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **80**, 661–671.
- Ripley, B. S., Abraham, T., Klak, C. & Cramer, M. D. (2013) How succulent leaves of Aizoaceae avoid mesophyll conductance limitations of photosynthesis and survive drought. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 5485–5496.
- Rodríguez-Sánchez, F., Pérez-Barrales, R., Ojeda, F., Vargas, P. & Arroyo, J. (2008) The Strait of Gibraltar as a melting pot for plant biodiversity. *Quaternary Science Reviews*, **27**, 2100–2117.

- Roquet, C. *et al.* (2009) Reconstructing the history of Campanulaceae with a Bayesian approach to molecular dating and dispersal–vicariance analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**, 575–587.
- Röschenbleck, J., Albers, F., Müller, K., Weinl, S. & Kudla, J. (2014) Phylogenetics, character evolution and a subgeneric revision of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *Phytotaxa*, **159**, 31–76.
- Sanmartín, I., Anderson, C.L., Alarcón, M., Ronquist, F. & Aldasoro, J.J. (2010) Bayesian island biogeography in a continental setting: the Rand Flora case. *Biology Letters*, **6**, 703–707.
- Senut, B., Pickford, M. & Ségalen, L. (2009) Neogene desertification of Africa. *Comptes Rendus Geoscience*, **341**, 591–602.
- Siesser, W. G. (1980) Late Miocene origin of the Benguela upswelling system off northern Namibia. *Science*, **208**, 283–285.
- Smitsen, R. D., Garnock-Jones, P. J. & Chambers, G. K. (2003) Phylogenetic analysis of ITS sequences suggests a Pliocene origin for the bipolar distribution of *Scleranthus* (Caryophyllaceae). *Australian Systematic Botany*, **16**, 301–315.
- Stuessy, T. F., Takayama, K., López-Sepúlveda, P. & Crawford, D. J. (2014) Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **174**, 276–288.
- Sytsma, K. J., Spalink, D. & Berger, B. (2014) Calibrated chronograms, fossils, outgroup relationships, and root priors: re-examining the historical biogeography of Geraniales. *Biological Journal of the Linnean Society*, **113**, 29–49.
- 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.
- Touloumenidou, T., Bakker, F. T., & Albers, F. (2007) The phylogeny of *Monsonia* L. (Geraniaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **264**, 1–14.

- Valente, L. M. & Vargas, P. (2013) Contrasting evolutionary hypotheses between two mediterranean - climate floristic hotspots: the Cape of southern Africa and the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, **40**, 2032–2046.
- Valtueña, F. J., López, J., Álvarez, J., Rodríguez-Riaño, T. & Ortega-Olivencia, A. (2016) *Scrophularia arguta*, a widespread annual plant in the Canary Islands: a single recent colonization event or a more complex phylogeographic pattern? *Ecology and Evolution*, **6**, 4258–4273.
- Van Zinderen Bakker, E. M. (1969) The Pleistocene vegetation and climate of the basin. *Kalambo Falls Prehistoric Site*, **1**, 57–84.
- Venter, H. J. (1983) Phylogeography and interspecies relationships in *Monsonia* (Geraniaceae). *Bothalia*, **14**, 865–869.
- Winter, B. D. (1971) Floristic relationships between the northern and southern arid areas in Africa. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*, **10**, 424–437.
- Winterbottom, J. M. (1967) Climatological implications of avifaunal resemblances between South Western Africa and Somaliland. *Palaeoecology of Africa*, **2**, 77–79.
- Yeo, P. F. (1984) Fruit-discharge-type in *Geranium* (Geraniaceae): its use in classification and its evolutionary implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **89**, 1–36.
- Young, A. J. & Desmet, P. G. (2016) The distribution of the dwarf succulent genus *Conophytum* NE Br. (Aizoaceae) in southern Africa. *Bothalia-African Biodiversity and Conservation*, **46**, 1–13.
- Zhang, Z., Ramstein, G., Schuster, M., Li, C., Contoux, C. & Yan, Q. (2014) Aridification of the Sahara Desert caused by Tethys Sea shrinkage during the Late Miocene. *Nature*, **513**, 401–404.

CONCLUSIONS

Conclusions (Català)

Capítol 1: Diversificació, història biogeogràfica i evolució dels fruits de les geraniàcies

- D'acord amb les nostres anàlisis filogenètiques, i coincidint amb estudis anteriors, tots els gèneres de *Geraniaceae* (*California*, *Erodium*, *Geranium*, *Monsonia* i *Pelargonium*) són monofilètics.
- El gènere *Pelargonium* (c. 270 espècies) és germà de la resta de geraniàcies, i es va originar a l'eocè (fa uns 45 Ma), probablement al sud d'Àfrica. *Monsonia* va aparèixer també al sud d'Àfrica durant l'oligocè (fa uns 29 Ma).
- L'ancestre comú més recent del clade corona de les geraniàcies (format pels gèneres *California*, *Erodium* i *Geranium*) va divergir a l'oligocè (32,5 Ma). Les nostres anàlisis biogeogràfiques no han estat concloents a l'hora de definir l'origen geogràfic d'aquest grup. Això es podria explicar per les altes capacitats de dispersió i colonització d'aquests llinatges. Aquesta habilitat podria estar relacionada amb l'annualitat, l'alta autogàmia o l'alta capacitat de dispersió dels seus fruits. Els canvis "clau" en el tipus d'hàbit (d'annual a perenne, i viceversa) i de fruit (triplanocàrpic o anemocor), van aparèixer en llinatges independents de la família i podrien haver influït en la seva dispersió i adaptació a nous hàbitats.
- La posició filogenètica del gènere *California* apunta que l'ancestre d'aquest gènere va aparèixer a l'oligocè i va arribar a Àsia des del nord d'Àfrica i, finalment, va colonitzar Amèrica del Nord.
- Els canvis climàtics passats i l'aparició de nombroses serralades muntanyoses a la conca mediterrània durant el miocè podrien haver afavorit l'adaptació a ambients freds i elevats d'alguns llinatges d'*Erodium* i *Geranium*.
- Algunes espècies de *Pelargonium*, *Geranium* i *Erodium* van arribar a Austràlia mitjançant esdeveniments de dispersió a llarga distància. D'acord amb les nostres estimacions, això va ocórrer a finals del miocè o a l'inici del pliocè. Pel que fa a l'origen geogràfic d'aquests esdeveniments, les nostres anàlisis biogeogràfiques han donat resultats ambigus.

- Les anàlisis de diversificació de les geraniàcies mostren dos augments significatius en la taxa de diversificació de la família: un en el gènere *Pelargonium*, al sud d'Àfrica durant el miocè (c. 12,5 Ma); i l'altre en *Geranium*, a Euràsia, també al miocè (c. 11,5 Ma).
- El gènere *Geranium* es va diversificar en la semiàrida conca mediterrània. Aquesta diversificació va ser probablement afavorida per la complexa topografia d'aquesta regió i per les oscil·lacions climàtiques estacionals. Més tard, *Geranium* va estendre la seva àrea de distribució a tots els biomes temperats i freds d'Europa, Àsia i Amèrica.

Capítol 2. Tendències oposades en el gènere *Monsonia* (*Geraniaceae*): especialització en els deserts africans i expansions a través de l'est d'Àfrica

- Les regions d'ADN ITS, *trnS^{GCU}-trnG^{UCC}*, *rbcL^{1F}-rbcL^{724R}*, *matK^{5F}-matK^{C2MR}* i *trnL^{UAA}-trnF^{GAA}* són marcadors útils per resoldre les relacions evolutives de les espècies de *Monsonia*.
- L'ancestre comú més recent de *Monsonia* va aparèixer al miocè (c. 21,8 Ma) al sud-oest d'Àfrica (Namib-Karoo i el Cap).
- Les regions del Namib-Karoo i el Cap van tenir un paper important com a bressol per als llinatges recents de *Monsonia* amb una tolerància incipient a l'aridesa, però també com a refugi per a llinatges més antics de plantes resistents a l'aridesa.
- Les espècies que habiten l'àrea del Namib-Karoo podrien haver-se adaptat paulatinament a les condicions cada cop més àrides de la regió, i després haurien ocupat hàbitats més frescos i amb boires de la costa de Namíbia. Això podria haver desencadenat l'especiació local a *Monsonia*.
- Els primers clades divergents de *Monsonia* presenten baixes taxes d'especiació, probablement corresponen a espècies amb un origen més antic i menys

tolerants a la sequera que es van dispersar cap al nord-est del continent per escapar de la desertització ocorreguda durant el miocè.

- Les dispersions de *Monsonia* des del sud-oest d'Àfrica cap al nord i l'est del continent van anar acompanyades de la colonització d'hàbitats més humits, com les sabanes, estepes, i boscos humits, i també d'un increment de l'amplitud de nínxol. L'elevació de les muntanyes del Drakensberg, al sud-est d'Àfrica, durant el pliocè, podria haver afavorit aquestes expansions de distribució.
- L'alta taxa de diversificació inferida pel nucli de *Monsonia* (constituït pel clade de les espècies suculentes i el de les espècies que habiten les muntanyes del Natal-Drakensberg) correspon a una radiació recent (c. 8 Ma) probablement per divergència ecològica.
- Algunes espècies suculentes de *Monsonia* presenten solapament de nínxol, i cap d'elles correspon a espècies germanes. Això suggereix que en aquest gènere no hi ha hagut una forta conservació de nínxol.
- Les espècies que habiten la costa de Namíbia presenten nínxols ecològics estrets, possiblement com a resultat de l'especialització a hàbitats hiperàrids i boirosos típics d'aquesta regió.
- Les espècies de *Monsonia* presenten dos tipus de sistemes de dispersió (anemocòria i tripanocàrpia) que podrien haver facilitat la colonització de diferents tipus d'hàbitats: les espècies tripanocàrpiques viuen en ambients semiàrids, mentre que les espècies anemocores creixen majoritàriament en deserts.
- La suculència va aparèixer només una vegada a *Monsonia*, en l'ancestre del grup *Sarcocaulon*. Aquest caràcter és probablement una adaptació als ambients àrids del desert del Namib-Karoo.
- A diferència d'altres espècies adaptades a l'aridesa amb metabolisme CAM, tots els tàxons de *Monsonia* mostren valors de l'isòtop de carboni $\delta^{13}\text{C}$ típics d'espècies amb metabolisme C_3 .

Capítol 3. Història biogeogràfica de les campanetes afromacaronèsiques (grup *Azorina*, *Campanulaceae*): refugis climàtics i rutes de dispersió a Àfrica

- El grup *Azorina*, dins del gènere *Campanula*, es va originar a partir d'un ancestre que va arribar al nord d'Àfrica des de l'oest Àsia durant el miocè tardà (c. 8,7–13,3 Ma). Les campanetes afromacaronèsiques es podrien haver adaptat a la incipient aridificació del nord d'Àfrica durant aquest període, possiblement gràcies a una combinació de característiques fisiològiques i morfològiques, com ara sistemes reproductius autògams o autògams facultatius, anualitat, llavors de fàcil dispersió, i la capacitat de créixer en diferent tipus de substrats i hàbitats pertorbats.
- Els ancestres de les espècies del grup *Azorina* van propagar-se des del nord d'Àfrica a àrees adjacents (Àfrica central; Àfrica oriental, Aràbia i Socotra; la Macaronèsia; i les penínsules del sud d'Europa).
- Hem inferit dos corredors de dispersió i expansió dels ancestres del grup *Azorina*: un corredor entre els massissos de l'est i l'oest del Magrib, i un altre a través del Sàhara, el qual hauria connectat el nord-oest d'Àfrica amb l'est d'Àfrica i la península d'Aràbia.
- El corredor de dispersió entre les muntanyes del Magrib es va datar fa 2,8–3,2 Ma, després de l'establiment del clima mediterrani a la regió i coincidint amb un període agut de desertització (2,4–2,9 Ma). Des d'aquest corredor es podrien haver produït dispersions per vent cap a la Macaronèsia i regions del sud d'Europa.
- Els sistemes muntanyosos del Sàhara haurien jugat un rol clau com a passeres migratòries en el corredor que s'estén a través d'aquest desert (des del nord-oest d'Àfrica a l'est d'Àfrica i Aràbia).
- Les campanetes del grup *Azorina* s'haurien adaptat amb èxit a la disparitat d'hàbitats d'Àfrica gràcies a una combinació de característiques citogenètiques i fisiològiques, com ara flexibilitat en el nombre cromosòmic

i el nivell de ploïdia, i un sistema reproductiu autògam o autògam facultatiu típic de plantes anuals.

- És necessari un estudi exhaustiu amb més dades morfològiques i genètiques per determinar si les espècies *Campanula edulis* i *Campanula mollis*, ambdues parafilètiques, haurien de ser revisades taxonòmicament.

Capítol 4. El nord-oest d'Àfrica com a font i refugi de biodiversitat vegetal: el cas d'estudi de *Campanula kremeri* i *Campanula occidentalis*

- L'ancestre comú més recent del llinatge comprès per *Campanula kremeri* i *C. occidentalis* estava distribuït pel nord-oest d'Àfrica, i va divergir fa 3,7 Ma en tres llinatges principals amb diferents rangs de distribució: i) les illes Canàries; ii) l'est del Rif i l'Atlas; i iii) l'oest del Rif i la península Ibèrica.
- *Campanula kremeri* presenta una distribució disjunta a banda i banda de l'estret de Gibraltar probablement com a resultat d'una colonització recent des dels massissos del Magrib durant les oscil·lacions climàtiques del plistocè. Els vents del llevant i les fluctuacions del nivell del mar podrien haver facilitat la dispersió de *C. kremeri* entre el Rif i la península Ibèrica.
- Els repetits esdeveniments d'expansió i retracció associats als canvis climàtics del plistocè al nord d'Àfrica haurien facilitat l'intercanvi genètic de les poblacions de *C. kremeri* entre els massissos del Magrib. Aquestes muntanyes haurien actuat com a refugis per plantes mediterrànies durant períodes interglacials, mentre que en períodes més freds haurien expandit la seva àrea de distribució i haurien colonitzat regions veïnes.
- L'edat de divergència estimada per *C. occidentalis* (c. 3,7 Ma), relativament antiga, juntament amb la seva baixa diversitat genètica, apunten a l'aïllament de les poblacions ancestrals de les poblacions de la costa atlàntica del Magrib, seguit d'una colonització recent de les illes Canàries. Aquesta espècie es podria haver extingit al continent, o bé podria ser que encara persistís en localitats desconegudes d'aquest territori poc explorat.

- Per aquest llinatge de campanetes, les regions amb més elevada diversitat genètica són les serralades de l'Atlas i el Rif. Això és possiblement degut a l'aïllament de les poblacions que habiten aquests massissos topogràficament complexos.
- Les dades del compartiment nuclear apunten a una introgressió entre les poblacions del nord-oest d'Àfrica de *C. kremeri*, suggerint que les barreres geogràfiques entre els massissos magribins no han estat sempre impermeables, com indiquen les dades dels AFLPs i els alts nivells de diversitat genètica de les poblacions del nord-oest d'Àfrica.

Conclusions (English)

Chapter 1: Diversification, biogeographic history and fruit evolution of Geraniaceae

- According to our phylogenetic analyses, and in agreement to previous studies, all genera of Geraniaceae (*California*, *Erodium*, *Geranium*, *Monsonia* and *Pelargonium*) are monophyletic.
- The genus *Pelargonium* (c. 270 species) is the sister group of the remaining genera of Geraniaceae, and it originated in the Eocene (c. 45 Ma), most probably in South Africa. *Monsonia* appeared in South Africa during the Oligocene (c. 29 Ma).
- The most recent common ancestor of the crown-clade of Geraniaceae (genera *California*, *Erodium* and *Geranium*) diverged in the Oligocene (c. 32.5 Ma). Our biogeographic analyses were not conclusive about their geographic origin. This could be due to the high dispersal and colonisation abilities of these lineages. These features may be linked to short-lived habit, high autogamy or to high dispersability of their fruits. Key changes in the habit (from annual to perennial, and viceversa) and fruit type (trypanocarpic or anemochorous), appeared in independent lineages of the family and could have influenced their dispersion and adaptation to new habitats.
- On the basis of the position of the genus *California* in the phylogenetic tree, we hypothesize that the ancestor of *California* appeared in the Oligocene and dispersed from North Africa to Asia, and finally colonized North America.
- Past climatic changes and the appearance of many mountain systems in the Mediterranean Basin during the Miocene could have favoured the adaptation to high and cold environments in some lineages of *Erodium* and *Geranium*.
- Some *Pelargonium*, *Geranium* and *Erodium* species dispersed to Australia via long-distance dispersal. According to our estimates, this occurred during the Miocene-Pliocene boundary. Regarding the geographic origin of these dispersals, our biogeographic analyses yielded ambiguous results.

- The diversification analyses in Geraniaceae show two major accelerations in diversification rate shifts: i) in *Pelargonium*, which occurred in southern Africa during the Miocene (c. 12.5 Ma); and ii) in *Geranium*, which took place in Eurasia, also during the Miocene (c. 11.5 Ma).
- The genus *Geranium* diversified in the semiarid Mediterranean Basin, likely favoured by the complex topography of this region and by seasonal climatic oscillations. Later, *Geranium* dispersed to all temperate and cool biomes of Europe, Asia and America.

Chapter 2. Opposite trends in the genus *Monsonia* (Geraniaceae): specialization in the African deserts and range expansions throughout eastern Africa

- The DNA regions ITS, *trn*^{SGCU}-*trn*^{G^{UCC}}, *rbcL*^{1F}-*rbcL*^{724R}, *matK*^{5F}-*matK*^{C2MR} and *trnL*^{UAA}-*trn*^{F^{GAA}} are useful markers to resolve the evolutionary relationships of *Monsonia* species.
- The most recent common ancestor of *Monsonia* appeared in the early Miocene (c. 21.8 Ma) in southwest Africa (the Namib-Karoo and Cape region).
- The Namib-Karoo-Cape region played a role as a cradle area of new drought-tolerant species of *Monsonia*, and also as a refuge for older drought-tolerant species.
- The species that inhabit the Namib-Karoo area could have adapted progressively to the increasingly arid conditions, and later occupied foggy and cooler habitats of the Namibian coasts. This could have triggered local speciation in *Monsonia*.
- The early diverging clades with low speciation rates of *Monsonia* likely correspond to older and less drought-tolerant species that dispersed north-eastward escaping from ongoing aridification in the Miocene.

- Dispersals of *Monsonia* from the southwest to the north and to east Africa were accompanied by colonization of wetter habitats such as savannahs, steppes, and wet forests, and also by an increase in niche breadth. The uplift of the Drakensberg Mountains (southeast Africa) in the Pliocene seems to have facilitated some of these range expansions.
- The high diversification rate inferred for the core of *Monsonia* (formed by the subclades of succulent species and the ones of the Natal-Drakensberg) correspond to a young radiation (c. 8 Ma) likely driven by ecological divergence.
- Only few succulent species of *Monsonia* show niche overlap, and none of them are sister-species, suggesting that niche conservatism was not prevalent in this genus.
- The narrow niche breadth presented by the coastal succulent species seem to be the result of the specialization to the hyper-arid and foggy habitats typical of these areas.
- *Monsonia* species exhibit two dispersal syndromes (trypanocarpic and anemochorous) that could have facilitated the colonization of different types of habitats: the trypanocarpic dispersal syndrome is more common in semiarid habitats, while anemochorous species grow mostly in deserts.
- The succulent life form evolved only once in *Monsonia*, in the ancestor of the group *Sarcocaulon*. This life form is likely an adaptation to arid environments in the Namib-Karoo desert.
- Unlike other arid-adapted taxa with CAM metabolism, all species of *Monsonia* show $\delta^{13}\text{C}$ values typical of C_3 metabolism.

Chapter 3. Biogeographic history of Afro-Macaronesian bellflowers (*Azorina*-group, Campanulaceae): searching for climatic refugia and dispersal routes in Africa

- The *Azorina*-group within *Campanula* originated from an ancestor that dispersed from West Asia to North Africa in the Late Miocene (c. 8.7–13.3 Ma). Afro-Macaronesian bellflowers would have adapted to the incipient aridification of North Africa during this period, likely thanks to a combination of physiological and morphological features, such as autogamous or facultative autogamous reproductive systems, short lifespan, easily dispersible seeds, and the ability to cope with a variety of disturbed habitats and substrates.
- Several dispersal events took place within the *Azorina*-group from North Africa to nearby adjacent regions (Central Africa; Eastern Africa, Arabia and Socotra; Macaronesia; and southern European Peninsulas).
- Two main dispersal corridors (which favoured range expansions within the *Azorina*-group) were detected: one between western and eastern Maghreb massifs, and another across north-western Africa, East of Africa and Arabia.
- The corridor between the Maghreb ranges was estimated at 2.8-3.2 Ma, after the onset of the Mediterranean climate and coinciding with the aridification peak at 2.4-2.9 Ma. It could also facilitated the dispersal by wind to Macaronesia and southern European islands and peninsulas.
- The Saharan mountains likely played an important role as dispersal stepping stones in the corridor extending across the Sahara (from north-west Africa to East Africa and Arabia).
- Bellflowers of the *Azorina*-group seem to have successfully adapted to the heterogeneous habitats of Africa, likely thanks to a combination of cytogenetic and physiological features, such as flexibility in chromosome number and ploidy level, and autogamous or facultative autogamous reproductive systems characteristic of annual plants.
- Further research is needed in the *Azorina*-group to unravel if the paraphyletic populations of *C. edulis* and *C. mollis* should be considered as separate species.

Chapter 4. North-west Africa as a source and refuge area of plant biodiversity: a case study on *Campanula kremeri* and *Campanula occidentalis*

- The most recent common ancestor of the lineage comprising *Campanula kremeri* and *C. occidentalis* was distributed in north-west Africa, and diverged 3.7 Ma into three main lineages with different geographical ranges: i) Canary Islands; ii) eastern Rif and Atlas; and iii) western Rif and Iberian Peninsula.
- The disjunct distribution across the Strait of Gibraltar of *C. kremeri* is probably the result of a recent colonization from the Maghrebian massifs during Pleistocene climatic oscillations. Levanter winds and sea-level drops could have facilitated the dispersal of *C. kremeri* between the Rif and the Iberian Peninsula.
- Repeated expansion-retraction events associated with Pleistocene climatic changes in North Africa facilitated gene flow across Maghrebian ranges in *C. kremeri*. These mountain massifs likely acted as refugia for Mediterranean plants during interglacial periods, whereas cooler periods triggered range expansion and dispersal to neighbouring regions.
- The relatively old age inferred for *C. occidentalis* divergence (c. 3.7 Ma) together with its low genetic diversity point to an isolation of ancestral populations in the Atlantic coast of Maghreb, followed by a recent colonization of the Canary Islands. This species may have become extinct in the mainland or may still persist in some unknown locations of this underexplored territory.
- The highest genetic diversity of *C. kremeri* is found in the Atlas and the Rif mountain ranges, likely triggered by genetic isolation amongst populations of these topographical complex massifs.
- The data of the nuclear compartment point to an introgression amongst the north-western African populations of *C. kremeri*, suggesting that geographic barriers between Maghrebian massifs have not always been completely impermeable, as indicated by the AFLP data and the high genetic diversity found within north-western African populations.

