



Programa de Pós - Graduação em Botânica

Museu Nacional – UFRJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro



**Hibridação, aspectos filogeográficos e delimitação de espécies
de *Vriesea* Lindl. (Bromeliaceae): *Vriesea simplex* (Vell.) Beer
e *Vriesea scalaris* E. Morren**

2012

Rio de Janeiro

RESUMO

Bromeliaceae esta entre as famílias de maior riqueza e diversidade na Floresta Atlântica. O extenso potencial de radiação adaptativa da família se reflete na grande diversidade de suas espécies. A região sudeste do Brasil é um dos importantes centros de diversificação e endemismo desta família. A circunscrição de gêneros e espécies muitas vezes falha em definir grupos naturais, sugerindo processos de especiação recente com espécies incipientes ainda não completamente definidas, e que podem ainda hibridizar. Sendo assim, problemas envolvendo a integridade de espécies nesta família é frequente o que aumenta a necessidade de estudos sobre aspectos do isolamento reprodutivo, sobre a ocorrência e relativa importância de cruzamentos interespecíficos entre espécies simpátricas e sobre aspectos relacionados à distribuição da diversidade genética. *Vriesea simplex* e *Vriesea scalaris* são bromélias que ocorrem ao longo da Floresta Atlântica Brasileira, e com distribuição simpátrica conhecida na região do Espírito Santo. Na região de ocorrência simpátrica já foram identificados híbridos putativos baseados em caracteres morfológicos. O objetivo desta proposta é a coleta de indivíduos de *V. simplex* e *V. scalaris* ao longo de sua distribuição geográfica e dos possíveis híbridos naturais, para que possa ser possível efetuar uma abordagem rigorosa e clara da variação morfológica e molecular destas espécies. Além disso, pretende-se otimizar protocolo de extração do DNA genômico total destas espécies e das condições de amplificação dos marcadores do cpDNA e do nDNA, na busca de marcadores polimórficos, de modo a permitir as análises moleculares filogeográficas e dos processos de hibridação/introgressão entre *V. simplex* e *V. scalaris*.

Palavras-chaves: filogeografia; especiação; isolamento reprodutivo; Bromeliaceae

EQUIPE EXECUTORA

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Executora: Doutoranda Jordana Néri (Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Orientadora: Dr. Tânia Wendt (Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro);

Co-orientadora: Dr. Clarisse Palma da Silva (Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Botânica de São Paulo).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o fluxo gênico intra- e inter-específico entre populações de *V. simplex* e *V. scalaris*, através da caracterização da estrutura genética populacional revelada por marcadores moleculares do genoma do cloroplasto e do núcleo e a variação morfológica dos táxons, afim de auxiliar na delimitação taxonômica e na avaliação do papel do fluxo gênico nos processos de especiação de espécies co-ocorrentes.

Objetivos específicos:

- Investigar possíveis eventos de hibridação e introgressão entre os táxons estudados.
- Analisar morfometricamente populações de *V. simplex* e *V. scalaris*
- Descrever a estrutura e variabilidade genética de *V. simplex* e *V. scalaris* utilizando marcadores moleculares do genoma nuclear e do cloroplasto;
- Cruzar dados morfométricos com dados moleculares dos espécimes estudados a fim de propor uma melhor adequação taxonômica para os táxons analisados;
- Levantar dados que auxiliam a delimitação taxonômica entre os táxons estudados;

JUSTIFICATIVA

Pelo fato da família Bromeliaceae ser considerada uma das mais representativas da Floresta Atlântica no Brasil e por esta região apresentar alta riqueza de espécies e níveis de endemismos, este cenário tem sido considerado uma arena para especiação e um excelente modelo para testar hipóteses sobre eventos de especiação e isolamento reprodutivo, hibridização e introgressão. Muitos dos aspectos básicos, como sistema reprodutivo, são desconhecidos para a maioria das espécies desta família. Informações sobre o impacto do sistema reprodutivo na estrutura genética e o fluxo gênico entre populações são ainda poucos conhecidos e são extremamente necessários para entendimento da origem e manutenção da biodiversidade. Além disso, o entendimento sobre processos de hibridização é de extrema importância para adequação taxonômica. A hibridização pode ter impacto na delimitação de espécies e na filogenia da família,

como apresentado por Schulte *et al* (2010). Por isso aprofundar a compreensão nessa questão é fundamental para classificar e entender a evolução deste grupo.

REVISÃO BIBLIOGRAFIA

Isolamento reprodutivo e Hibridação

O processo de especiação se dá pela divisão, dentro de populações, em unidades evolutivas independentes, envolvendo a separação genética e diferenciação fenotípica (Coyne & Orr, 2004; Savolainen *et al.*, 2006). Este processo pode ser desencadeado por alterações geográficas, ecológicas, morfológicas ou comportamentais tendo os mecanismos de seleção natural e deriva gênica fortemente atuantes (Petit & Excoffier, 2009; Stearns & Hoekstra, 2000). Assim, o processo de especiação, em organismos de reprodução sexual, resulta da evolução de mecanismos de isolamento reprodutivo entre populações naturais. Estes mecanismos devem ser mantidos para que as espécies incipientes permaneçam como entidades evolutivas distintas. O isolamento reprodutivo é mantido por barreiras que impedem as trocas gênicas (Coyne & Orr, 2004).

O isolamento reprodutivo na maior parte das plantas é consequência de um grande número de barreiras pré e pós-zigóticas (Rieserberg & Willis, 2007). Os mecanismos pré-zigóticos impedem o cruzamento e a fecundação, podendo incluir: barreiras temporais e espaciais (ex. diferentes épocas de floração), sistemas genéticos de incompatibilidade, competição gamética e modificações na estrutura floral que alteram o comportamento do polinizador (Judd *et al.*, 2009). Os mecanismos pós-zigóticos são aqueles que diminuem o sucesso e a viabilidade do híbrido formado, podendo incluir: inviabilidade, esterilidade e degeneração do híbrido (Levin, 1971).

Os mecanismos de isolamento reprodutivo nem sempre são completos (Wu, 2001), a força e a permeabilidade das barreiras pós e pré-cruzamento são altamente variáveis entre as espécies, e o cruzamento interespecífico é comum, o que gera a ocorrência de hibridação (Coyne & Orr, 2004). A hibridação é um fenômeno importante na evolução de plantas como fonte de novas combinações genéticas e como mecanismo para especiação (Judd *et al.*, 2009; Rieserberg *et al.*, 2000). Algumas das consequências potenciais deste mecanismo são: reforço de mecanismos de isolamento reprodutivo; formação de um complexo híbrido; introgressão (incorporação permanente de genes de uma espécie em outra espécie); criação de diversidade genética e adaptação (Levin, 1993). O problema central da especiação é entender a origem das barreiras de

isolamento que atuam ou potencialmente previnem o fluxo gênico em simpatria (Widmer *et al.*, 2009). A presença de fluxo gênico inter-específico (introgressão) indica que as barreiras do isolamento reprodutivo são incompletas (Mayr, 1942). Neste contexto a filogeografia permite detectar eventos de fluxo gênico histórico, podendo discriminar padrões genéticos causados por eventos de fluxo gênico atual ou ancestral. Tais informações são essenciais para distinguir processos populacionais, tais como a fragmentação e isolamento reprodutivo, colonização e expansão populacional, de processos contemporâneos, como a restrição espacial do fluxo gênico (Schaal *et al.*, 1998).

Filogeografia

As oscilações climáticas do Quaternário causaram profundos efeitos sobre a distribuição de habitats e espécies (Jansson & Dynesius 2002). Para muitos organismos isto resultou em contração das populações e disjunção de refúgios durante os períodos glaciais que dominaram grande parte dos últimos dois milhões de anos, com expansões durante os períodos interglaciais (Hewitt 2004). Um potencial resultado deste processo é a formação de zonas de contato, regiões onde conjuntos inteiros de espécies estabelecem contato secundário entre linhagens isoladas, em alguns casos hibridizam e em outros formam apertados limites parapátricos (Swenson & Howard 2005). Essas zonas oferecem uma oportunidade para comparar níveis e padrões de isolamento reprodutivo em relação à divergência histórica e evolução fenotípica dos táxons

Sendo assim, o método filogeográfico permite detectar linhagens evolutivas morfologicamente crípticas e pode distinguir entre contato secundário de linhagens anteriormente isoladas, e de diferenciação parapátrica, ou seja, estabelecimento de diferentes fenótipos dentro de uma população através de um gradiente ambiental acentuado (Hewitt 2001).

Marcadores moleculares são importantes no estudo de padrões filogeográficos e de hibridação natural, pois são capazes de detectar até mesmo baixos níveis de fluxo gênico interespecífico (introgressão). Os marcadores moleculares são úteis porque disponibilizam claras descrições da estrutura das zonas híbridas, as quais são frequentemente misturas de indivíduos com padrões ancestrais complexos e porque também podem ser utilizados para inferir trocas gênicas, recombinação e seleção (Petit & Excoffier, 2009).

Atualmente existem várias técnicas em biologia molecular que permitem a detecção da variação genética ao nível do DNA. Marcadores moleculares do tipo microssatélites nucleares (nuSSR) e o sequenciamento direto de regiões do genoma (cloroplasto) são exemplos de técnicas moleculares bastante usadas para estudos filogeográficos e para a relação entre a genética de populações e isolamento reprodutivo em plantas.

A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae apresenta cerca de 60 gêneros e 3000 espécies (Smith & Till, 1998) com distribuição geográfica restrita às Américas. Seu limite norte de ocorrência são nos estados da Virgínia, Texas, Califórnia e nos Estados Unidos; e o limite sul no norte da Patagônia e na Argentina, com exceção para *Pitcairnia felicianae* (A. Chev.) Harms & Mildbr. que ocorre no Oeste da África, na região da Guiné (Porembski & Barthlott, 1999).

Bromeliaceae é composta por espécies que sofreram uma extensa radiação adaptativa e esta entre as famílias de maior riqueza e diversidade na Floresta Atlântica. (Martinelli *et al.*, 2008; Amorin *et al.*, 2005). A região sudeste do Brasil é um dos importantes centros de diversificação e endemismo desta família (Fontoura *et al.*, 1991; Benzing, 2000; Versieux & Wendt, 2006, 2007). O extenso potencial de radiação adaptativa da família se reflete na grande diversidade de suas espécies. Além disso, a circunscrição de gêneros e espécies muitas vezes falha em definir grupos naturais, sugerindo processos de especiação recente com espécies incipientes, ainda não completamente definidas (Canela *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2007). Devido à alta diversidade encontrada nesta família, é frequente a atribuição de vários nomes ao mesmo morfotipo (Wendt *et al.*, 2010).

O padrão de florescimento em épocas sobrepostas para espécies congênicas é comum na família Bromeliaceae (Machado & Semir, 2006; Costa & Wendt, 2007; Wendt *et al.*, 2008; Matallana *et al.*, 2010) e, de certa forma, esta ocorrência simpátrica pode estar envolvida com a manutenção e abundância de polinizadores. Entretanto, este aumento de polinizadores em populações mistas de espécies simpátricas pode levar à troca interespecífica de pólen. No entanto, mesmo havendo troca interespecífica de pólen, se espera a ocorrência de barreiras de isolamento efetivas entre espécies de bromélias simpátricas (Wendt *et al.*, 2008). Poucos ainda são os estudos que verificam o isolamento reprodutivo e hibridação em espécies congênicas de Bromeliaceae (Wendt

et al., 2001; 2002; 2008; Matallana *et al.*, 2010; Schulte *et al* 2010; Palma-Silva *et al.*, 2011).

A caracterização da hibridação interespecífica e avaliação do isolamento reprodutivo em espécies de plantas tem sido o foco de estudos recentes (Wendt *et al.*, 2001; 2002; Cozzolino *et. al.*, 2006; Minder *et al.*, 2007; Lexer & Widmer, 2008; Wendt *et al.*, 2008; Matallana *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2010; Schulte *et al* 2010; Palma-Silva *et al.*, 2011). Vários métodos têm sido usados para entender a importância das barreiras de isolamento reprodutivo e possíveis eventos de hibridização, incluindo a morfologia dos híbridos, testes de hibridização artificial, caracterização de mecanismos pós e pré zigóticos (Motley & Carr, 1998; Wendt *et al.*, 2000 Wendt *et al.*, 2001) e mais recentemente os métodos baseados no uso de marcadores moleculares do DNA, como :revisão por Mallet (2005), Baack & Rieseberg (2007) e estudos feitos por Pinheiro *et al.* (2010) e Palma-Silva *et al.*:(2011).

Vários estudos moleculares, tanto de espécies animais como vegetais, já foram realizados, com objetivo de resolver problemas de delimitação de espécies e compreender o papel das diferentes barreiras de isolamento reprodutivo (Lorenz–Lemke *et al.*, 2005; Koehler-Santos *et al.*, 2006; Grazziotin *et al.*, 2006; Pellegrino *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2010; Palma-Silva *et al.*, 2011, entre outros). Estudo molecular envolvendo espécies simpátricas de *Pitcairnia* (*P. albiflos*, *P. staminea*, *P. corcovadensis* e *P. flammea*) foi conduzido por Palma-Silva *et al.* (2011), com objetivo de avaliar qual o papel das diferentes barreiras do isolamento reprodutivo na manutenção da integridade entre as espécies e qual o papel do fluxo gênico na especiação destas bromélias. Neste estudo os resultados de marcadores do genoma nuclear e do cloroplasto detectaram a ocorrência de hibridação e introgressão entre pares de espécies (*P. albiflos* e *P. staminea*) e que barreiras reprodutivas são fortes, apesar de permeáveis ao fluxo gênico. Os resultados cruzados dos marcadores moleculares, indicando baixo fluxo gênico interespecífico e testes de biologia reprodutiva indicaram que a integridade das espécies é mantida pela ação simultânea de barreiras pré-zigóticas, incluindo períodos de floração, incompatibilidade e sistema reprodutivo diferenciado (autofertilização *versus* fertilização cruzada).

1.4 Espécies selecionadas: *Vriesea simplex* e *Vriesea scalaris*

O gênero *Vriesea* Lindl. pertence a subfamília Tillandsioideae sendo composto aproximadamente por 256 espécies (Luther, 2006). Este gênero apresenta ampla

distribuição, podendo ser encontradas espécies desde a América Central até ao Sul da América do Sul (Smith & Downs, 1977).

Vriesea scalaris E. Morren é uma espécie epífita endêmica da floresta Atlântica no Brasil (Forzza *et al.*, 2010). Sua distribuição geográfica contempla o Nordeste (Pernambuco e Bahia), Sudeste (Minas gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) e o Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Forzza *et al.*, 2010). *Vriesea simplex* (Vell.) Beer é uma espécie epífita nativa da Floresta Atlântica, com distribuição restrita aos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Forzza *et al.*, 2010).

A identificação destas duas bromélias requer extremo cuidado, devido alta semelhança morfológica, o que pode causar inadequação taxonômica na identificação. Estas duas espécies de bromélias possuem a maior parte de suas flores visitadas por beija-flores e apresentam extensa sobreposição nos períodos de floração (de Março à Agosto em *V. scalaris* e Janeiro à Dezembro em *V. simplex*) (Wendt *et al.*, 2008), o que pode levar a troca interespecífica de pólen. A ocorrência de híbridos putativos entre esses dois táxons foi observada, mas nenhum estudo aprofundado sobre fluxo gênico interespecífico (hibridação e introgressão) foi realizado até o momento (Wendt, informação pessoal).

MATERIAL E MÉTODOS

Pelo fato do trabalho ter também uma abordagem filogeográfica (análise da estrutura genética ao longo da distribuição geográfica), serão coletadas populações de *Vriesea simplex* e *Vriesea scalaris* ao longo de toda a sua distribuição que compreendem os seguintes estados:

Vriesea simplex: BA, ES, RJ, SP;

Vriesea scalaris: PE, PR, ES, MG, RJ, SC;

Para a identificação de populações destas espécies no estado de Paraná serão feitas expedições na seguinte área (a qual apresenta a ocorrência da espécie, pela consulta prévia de herbários):

- Estação Ecológica da Ilha do Mel

Trabalho de campo: serão feitas expedições de coleta de material botânico em trilhas na área do parque, com ênfase em regiões que já tenham registro das espécies para

melhor identificação das populações; As expedições de coleta terão duração de aproximadamente cinco dias; Como as espécies estudadas são epífitas, e caso estejam acima de 2 metros de altura, as mesmas serão coletadas com auxílio de tesoura de poda alta; Exemplares do material botânico serão herborizados por técnicas usuais de herborização e depositados no herbário do Museu Nacional (R). Serão também feitos registros fotográficos do material coletado;

Material coletado: Em cada área amostrada serão coletadas 20-30 indivíduos para caracterização das populações; Haverá o cuidado de coletar apenas 3 folhas da roseta e a inflorescência da mesma para as análises morfométricas e para as análises moleculares referentes a filogeografia, por isso a coleta não afetará a sobrevivência da planta; Os indivíduos serão georeferenciados com GPS para posteriores análises de isolamento por distância. As folhas de diferentes indivíduos serão coletadas para extração do DNA, para isso pedaços da folha serão armazenados em sílica gel para proteção do material, a fim de evitar a degradação do DNA.

Análises morfométricas

As informações morfológicas serão tabuladas em uma matriz de táxons por caracteres com auxílio do editor de arquivos em formato Nexus NDE 0.5.0 (Page 2001). Para o tratamento estatístico, serão realizadas análise de variância univariada (ANOVA) e análise discriminante. Todas as variáveis serão testadas quanto à normalidade com o teste Kolmogorov-Smirnov. Será realizado o teste Tukey HSD para tamanhos amostrais diferentes (Spjøtvoll-Stolin, $p < 0.005$) afim de comparação a posteriori de cada par de médias. Todas as análises serão realizadas com o auxílio do software STATISTICA 4.2 (StatSoft Inc., 1993).

Marcadores moleculares para o estudo Filogeográfico

Marcadores universais do genoma do cloroplasto (cpDNA) serão testados quanto aos índices de polimorfismos através de seqüenciamento direto (Taberlet *et al.*, 1991; Hamilton, 1999; Weising & Gardner, 1999; Grivet *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2007; Scarcelli *et al.*, 2011). Marcadores microsatélites nucleares previamente caracterizados para espécies de bromélias dos gêneros, *Tillandsia* e *Guzmania* (Boneh *et al.*, 2003), *Alcantarea* e *Vriesea gigantea* (Palma-Silva *et al.*, 2007) serão utilizados para o estudo da estrutura e diversidade genética.

As análises estatísticas do estudo de hibridação e introgressão entre as espécies de *V. scalaris* e *V. simplex* serão feitas considerando o conjunto de dados de nuSSR (microssatélites do genoma nuclear) e sequenciamento do cpDNA (genoma do cloroplasto).

Análises para os marcadores do cloroplasto (cpDNA)

Os haplótipos do cpDNA serão definidos utilizando o software DNASP5. Os parâmetros de diversidade também serão estimados no DNASP5. As relações genealógicas entre os haplótipos serão determinadas por meio de uma análise de rede “Network”, com uso do algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) implementado no programa NETWORK4.1 (Fluxus Technology Ltd. At www.Fluxus-engineering.com).

Para os dados de cpDNA serão calculados os seguintes parâmetros: número efetivo de alelos (A_E), e o coeficiente de diversidade genética de Nei (H_E , Nei, 1987) utilizando o programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005).

Os padrões de distribuição da variabilidade genética e diferenciação entre populações e entre os grupos de populações serão analisados através da Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se o programa ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005). Os parâmetros *Gst* e *Nst*, baseados no genoma cloroplástico, serão calculados utilizando-se o programa PERMUT (Pons & Petit, 1996).

Análises para marcadores microssatélites nuclear (nuSSR)

Os níveis de diversidade genética nuclear serão estimados para cada população de ambas as espécies através: do número de alelos (A_E), da Heterozigozidade observada (H_O) e da Heterozigozidade esperada (H_E) utilizando o software Fstat 1.2 (Goudet, 1995). Também serão estimados os coeficientes de endocruzamento F_{IS} (Weir & Cockerham, 1984) para cada população.

Como para o cpDNA, a AMOVA será usada para calcular a estruturação genética intraespecífica do DNA nuclear. Além disso, a AMOVA será usada para análise de diferenciação genômica em modelos hierárquicos incluindo as duas espécies. A hipótese de isolamento por distância será feita pelo cálculo de correlação entre estrutura genética e distância geográfica através do Teste de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995).

Para os dados de nuSSR serão calculados as estimativas da taxa de fluxo gênico pelo cálculo do número de migrantes, utilizando a teoria da coalescência e método de

máxima verossimilhança, através do programa MIGRATE 3.0 (Beerli & Felsenstein, 1999). A estrutura genética das populações de ambas as morfoespécies serão analisadas, para um conjunto de dados de nuSSR por meio de análises no Programa STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000) a fim de classificar os indivíduos em diferentes grupos (K) e para identificação híbridos.

Teste de Desequilíbrio Cito-nuclear

Para testar um possível papel da incompatibilidade cito-nuclear e para explorar os padrões e consequências do fluxo gênico inter-específico entre as espécies *V. simplex* e *V. scalaris*, os desvios das associações cito-nucleares (Arnold, 1993) serão testados através do programa CNDm (Basten & Asmussen, 1997). As análises serão realizadas através da codificação de marcadores nucleares na forma de alelos sintéticos (S, alelos típicos para *V. simplex* e A, alelos típicos para *V. scalaris*) e de marcadores do cloroplasto como haplótipos sintéticos (Hs, haplótipos típicos para *V. simplex* e Ha, haplótipos típicos para *V. scalaris*). Valores significativamente positivos e negativos de CND indicam associações positivas e negativas entre o genoma nuclear e citoplasmático, respectivamente. Desequilíbrio significativo envolvendo locos heterozigotos nuclear (AS) – representado por D2(AS/Hs) – aponta para acasalamento não aleatório em zonas híbridas e hibridização unidirecional, enquanto desequilíbrio significativos envolvendo genótipos homozigotos D1 e D3 (envolvendo genótipo nuclear SS e AA, respectivamente) apontam para barreiras à introgressão, garantindo que a integridade das espécies é efetivamente mantida.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO PARA AS UNIDADES DO PARANÁ

Para execução do trabalho de campo, necessito do período de um ano de licença de coleta para Estação Biológica da Ilha do Mel

A primeira excursão de campo - 18-28/02 de 2013

Demais datas serão ajustadas entre o prazo de um ano, a partir da liberação da licença.

Obs: datas podem sofrer ajustes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, J. 1993. Cytonuclear disequilibria in hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 521-554.
- Amorin, A. M.; Fiachi, P.; Jardim, J. G.; Thomas, W. W.; Clifton, B. C.; Carvalho, A. M. V. 2005. The vascular plants of a forest fragment in southern Bahia, Brazil. *Sida* 21: 1727-1752.
- Baack, E.J. & Rieseberg, L. H. 2007. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 513-518.
- Basten, C. J. & Asmussen, M. A. 1997. The exact test for cytonuclear disequilibria. *Genetics* 146: 1165-1171.
- Bandelt, H. J.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Benzing, D. H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, Cambridge University Press
- Beerli, P. & Felsenstein, J. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152: 763-773.
- Boneh, L.; Kuperus, P.; Van Tienderen, P. H. 2003. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. *Molecular Ecology Notes* 3: 302-303.
- Costa, A. F. & Wendt, T. 2007. Bromeliaceae na região de Macaé de Cima, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguesia* 58:905-939.
- Coyne, J. A. 1994. Ernst Mayr and the origin of species. *Evolution* 48:19-30.
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. 2004. Speciation. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Cozzolino, S.; Nardella, A. M.; Impagliazzo, S.; Widmer, A.; Lexer, C. 2006. Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation* 129: 14-23.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and species analysis. *Curr. Ornithol* 1:159-87.
- De Souza, L. O. F.; Wendt, T.; Brown, G.T. 2007. Monophyly and phylogenetic relationships in *Lymania* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on morphology and chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany*, 32(2): 264-270.

- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Faria, A. P. G, Wendt, T.; Brown, G. K .2004. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and aliied genera. *Ann Mo Bot Gard* 91: 303-319.
- Forzza, R. C.; Costa, A.; Siqueira Filho, J. A.; Martinelli, G. 2010. Bromeliaceae *in* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006554>).
- Fontoura, T.; Costa, A; Wendt, T. 1991. Preliminary checklist of the Bromeliaceae of Rio de Janeiro state, Brazil. *Selbyana* 12:5–45.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Grazziotin, F. G.; Monzel, M.; Echeverrigaray, S.; Bonatto, S. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15: 3969-3982.
- Grivet, D.; Heinze, B.; Vendramin, G. G.; Petit, R. J. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 1: 345-349.
- Hamilton, M. B. 1999. Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521-523.
- Hewit, G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space an time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- Hewit, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 359: 183-195.
- Jonsson, R. & Dynesius, M. 2002. The fate of clade in a world of recurrent climatic change: Milankovich oscillations and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 741-777.
- Judd, W. S.; Campebell, C.S.; Kellong, E. A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M. J. 2009. *Sistemática Vegetal, um enfoque filogenético*. Artmed.

- Koehler-Santos, P.; Lorenz-Lemke, A. P.; Muschner, V. C.; Bonatto, S. L.; Salzano, F. M.; Freitas, L. B. 2006. Molecular genetic variation in *Passiflora alata* (Passifloraceae), an invasive species in southern Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 611-630.
- Levin, D. A. 1971. The origin of reproductive isolating mechanisms in flowering plants. *Taxon* 20: 91-113
- Levin, D. A. 1993. Local speciation in Plants: The Rule Not the exception. *Systematic Botanic* 18:197-208.
- Lexer, C & Widmer, A. 2008. The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions. *Philosophical Transactions the Royal Society* 363:3023-3036.
- Luther, H. D. 2006. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. The Bromeliad Society International, Sarasota, Florida.
- Lorenz-Lemke, A. P.; Muschner, V. C.; Bonatto, S. L.; Cervi, A. C.; Salzano, F. M.; Freitas, L. B. 2005. Phylogeographic Inferences Concerning Evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) Variation. *Annals of Botany* 95:799-806.
- Machado, C. G. & Semir, J. 2006. Fenologia da floração e biologia floral de bromeliáceas ornitófilas de uma área da Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 163-174.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20(2): 229-237.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia Univ. Press, New York, USA.
- Martinelli, G.; Vieira, C. M.; Gonzalez, M.; Leitman, P., Piratininga, A.; Costa, A. F.; Forzza, R. C. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguesia*, 59(1): 209-258.
- Martinelli, G. & Forzza, R. C. 2006. *Pitcairnia* L Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L.B.Sm.. *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 603-607.
- Matallana, G.; Godinho, M. A. S; Guilherme, F. A. G; Belisário, M.; Coser, T. S; Wendt, T. 2010. Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Syst Evol* 289:57-65

- Minder, A. M.; Rothenbuehler, C.; Widmer, A. 2007. Genetic structure of hybrid zones between *Silene latifolia* and *Silene dioica* (Caryophyllaceae): evidence for introgressive hybridization. *Molecular Ecology* 16: 2504-2516.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Palma-Silva, C.; Cavallari, M. M.; Barbara T; Lexer, C.; Gimenes, A. M.; Bered F; Bodanese-Zanettini, M. H. 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*, 7: 654-657.
- Palma-Silva, C.; Wendt, T.; Pinheiro, F.; Barbara, T.; Fay, M. F; Cozzolino, S.; Lexer, C. 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* 1-17.
- Petit, R. J. & Excoffier, L. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (7): 386-393.
- Pellegrino, K. C. M.; Rodrigues, M. T.; Waite, A. N.; Morando, M.; Yassuda, Y. Y.; Sites Jr. J.W. 2008. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13-26.
- Pinheiro, F.; Barros, F.; Palma-Silva, C.; Meyer, D.; Fay, M.F.; Suzuki, R.M.; Lexer, C.; Cozzolino, S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 1-14.
- Pons, O. & Petit, R. J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered and unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.
- Porembski, S & Barthlott, W. 1999. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. *Harv Paper Bot* 4: 175-184
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Reitz, R. 1983. Bromeliáceas e a malária - Bromélia endêmica. *Flora Illustrada Catarinense* (Reitz R., Ed). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí: 1-559

- Savolainen, V.; Anstett, M. C.; Lexer, C.; Hutton, I.; Clarkson, J.; Norup, M.; Powell, M.P.; Sprigge, D.; Salamin, N.; Baker, W.J. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* 441: 210-213.
- Schulte, K.; Silvestro, D.; Kiehlmann, E.; Vesely, S.; Novoa, P.; Zizka, G. 2010. Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*: 1-15.
- 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 1. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Sokal, R. & Rohlf, F. 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman and Company, New York.
- Smith, C. B & Till W. 1998. Bromeliaceae. In: Kubitzki k (ed) *The families and genera of vascular plants. IV. Flowering plants: Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)*. Springer, Berlin, pp 74-99.
- Smith, L. B & Downs, R. J. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*, 14(2): 663-1492.
- Stearns, S. C. & Hoekstra, R. F. 2000. *Evolution: an introduction*. Oxford University Press Inc., New Work, 381p.
- Swenson, N. G. & Howard, D. 2005. Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. *The American naturalist* 166(5): 581-591.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal iniciadores for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Versieux, L. M. & Wendt, T. 2006. Checklist of Bromeliaceae of Minas Gerais, Brazil, with notes on taxonomy and endemism. *Selbyana* 27:107–146
- Versieux, L. M. & Wendt, T. 2007. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodivers Conserv* 16:2989– 3009
- Weising, K. & Gardner, R. C. 1999. A set of conserved PCR iniciadores for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.

- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wendt, T. 1997. A review of the subgenus *Pothuava* (Baker) Baker of *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) in Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 125: 245-271.
- Wendt, T.; Canela, B. F.; Faria, A. P. G; Rios, R. I. 2001. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 88:1760–1767.
- Wendt, T.; Canela, M. B. F.; Klein, D. E.; Rios, R. I. 2002. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Syst Evol* 232: 201-212.
- Wendt, T.; Coser, T. S.; Matallana, G.; Guilherme, F. A. G. 2008. An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 275: 31-41.
- Wendt, T.; Coser, T. S.; Boudet-Fernandes, H.; Martinelli, G. 2010. Bromeliaceae do município de Santa Tereza, Espírito Santo: lista de espécies, distribuição, conservação e comentários taxonômicos. *Bol. Mus. Biol. Mello Leitão (N. SÉR.)*. 27: 21-53.
- Widmer, A.; Lexer C.; Cozzolino, S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*: 102, 31-38.
- Wu, C. I. 2001. The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 851–865.