

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Hibridação de três espécies de pétalas amarelas de *Aechmea* subgênero *Ortgiesia*
(Bromeliaceae)**

Laís Mara Santana Costa

Porto Alegre, maio 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Hibridação de três espécies de pétalas amarelas de *Aechmea* subgênero *Ortgiesia*
(Bromeliaceae)**

Laís Mara Santana Costa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Fernanda Bered
Coorientadora: Dra. Márcia Goetze

Porto Alegre, maio 2017

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Genética e Conservação de Plantas (NGCP), ligado ao Laboratório de Genética Vegetal, Departamento de Genética da UFRGS e no Departamento de Botânica da UFRGS, Porto Alegre, Brasil. O projeto foi subvencionado pelo Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Edital Universal 2014).

A mestranda obteve bolsa de estudos da CAPES (24 meses).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo fôlego de vida de cada dia, pela saúde, proteção e auxílio até esse presente momento.

À minha família, Flávia, Jonas e Mateus pelo apoio, carinho e compreensão.

À minha orientadora Dra Fernanda Bered pela orientação, confiança, ensinamentos, apoio e paciência durante esses dois anos.

À minha coorientadora, Dra Márcia Goetze, por todos os ensinamentos desde do campo até as análises de dados, pela ótima coorientação, discussões, pela enorme paciência, conversas, motivação, companheirismo e amizade.

Às meninas do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, Camila Aguiar, Luiza Hirsch, Cristina Todeschini e Renata Ruas, pelas conversas, discussões, auxílio no laboratório e no campo e pelos momentos de descontração.

À Camila Zanella pelos ensinamentos, apoio e conversas.

À professora Sidia Jacques por todos os ensinamentos, conversas e paciência.

À todos que me ajudaram nas coletas, Silvâneo (Unidade de Conservação Ambiental Desterro), Ciro e Renato (RPPN Morro das Aranhas), Juares e Christian Rohr.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de cursar o mestrado e pelo apoio financeiro.

Aos professores do PPGBM pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos, contribuindo para minha formação.

Ao secretário do PPGBM Elmo Cardoso, pelo suporte burocrático e paciência.

Ao professor Jorge Ernesto Mariath pela autorização do uso do Bromeliário da UFRGS.

À Juliana Troleis e Carolina Breitsameter pela ajuda no Bromeliário.

Aos novos amigos de POA, Cristina, Fabiana, Ronaldo pela convivência, conversas, passeios, caronas e tocatas.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho,

Muito Obrigada.

Sumário

Resumo	4
Abstract	5
Capítulo I- Introdução Geral	6
1 Família Bromeliaceae	7
1.1 Evolução e Filogenia da Família Bromeliaceae	9
1.2 Subfamília Bromelioideae	10
1.3 Evolução e Filogenia da subfamília Bromelioideae	11
1.4 Gênero <i>Aechmea</i> e sua problemática taxonômica	13
1.5 Subgênero <i>Ortgiesia</i>	14
1.6 <i>Aechmea comata</i> , <i>A. caudata</i> e <i>A. kertesziae</i>	17
2 Conceitos de espécie	21
3 Delimitação Taxonômica	22
4 Hibridação	24
5 Problemática do estudo	27
6 Objetivo Geral	28
6.1 Objetivos Específicos	29
Capítulo II – Hybridization in sympatric bromeliad species (<i>Aechmea</i> spp.): The maintenance of the species boundary in <i>A. comata</i>.....	30
Capítulo III – Considerações Finais	91
Capítulo IV – Referências Bibliográficas dos Capítulos I e III.....	94

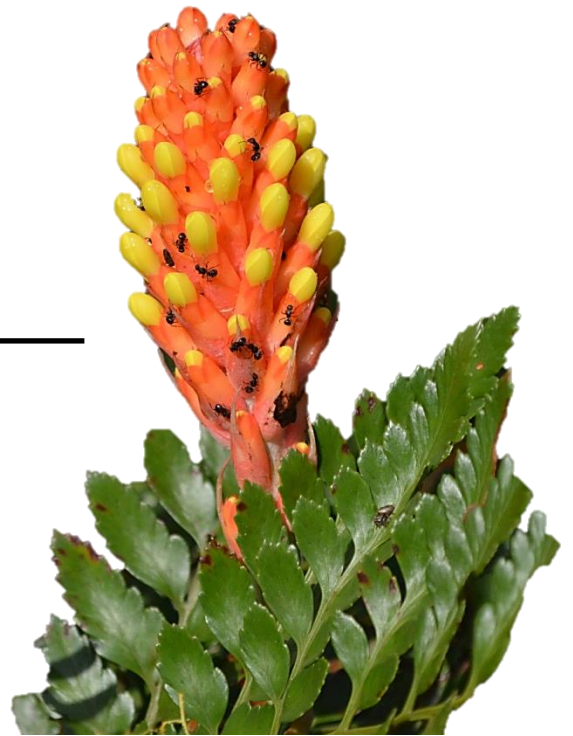
Resumo

Aechmea é reconhecido como o maior e mais problemático gênero (taxonomicamente) dentro da subfamília Bromelioideae (Bromeliaceae), apresentado grande variabilidade morfológica, reprodutiva e vegetativa. Um recente estudo envolvendo as espécies de *Aechmea* subgênero *Ortgiesia* detectou um híbrido putativo entre *Aechmea comata* (Gaudich.) Baker e *A. caudata* Lindm. No mesmo estudo, *A. comata* e *A. kertesziae* Reitz demonstraram um compartilhamento de haplótipos plastidiais, o que pode ser devido à retenção de polimorfismo ancestral, à ocorrência de hibridação, ou mesmo ao fato dessas espécies serem um único *taxa*, já que a delimitação usando morfologia é desafiadora. Estas três espécies sobrepõem período de floração, compartilham um polinizador e são encontradas em simpatria (*A. comata* e *A. caudata*) (*A. comata* e *A. kertesziae*) na Ilha de Santa Catarina. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a delimitação taxonômica e a hibridação entre essas três espécies. Para isso, foram utilizados dez marcadores de microsátélites nucleares (nuSSR) e seis plastidiais (cpSSR), dados morfológicos e ecológicos, bem como experimentos de polinização controlados. Foram amostrados 244 indivíduos pertencentes às três espécies, oriundos de quatro populações alopátricas e quatro populações simpátricas. As análises bayesianas indicaram que cada espécie apresenta um perfil genético distinto, embora híbridos tenham sido identificados pelas análises moleculares. *Aechmea comata* demonstrou a maior diversidade genética já relatada para bromélias. Os híbridos identificados pelas análises bayesianas não apresentaram morfologia intermediária, dificultando sua identificação na natureza. Os dados morfológicos e ecológicos apoiam os dados moleculares de que *A. comata*, *A. caudata* e *A. kertesziae* são entidades distintas. *Aechmea kertesziae* apresentou sobreposição de características morfológicas com *A. comata* e *A. caudata*, devido à grande variabilidade intraespecífica. A análise ecológica demonstrou que as três espécies têm diferentes preferências de microhabitat. Dados de cruzamentos artificiais confirmaram a compatibilidade reprodutiva de *A. comata* com *A. caudata* e *A. kertesziae*. É provável que um conjunto de barreiras pré-zigóticas, como isolamento fenológico e etológico, autocompatibilidade e talvez barreiras pós-zigóticas, como baixa viabilidade ou esterilidade dos híbridos (incompatibilidades pós-zigóticas de Bateson-Dobzhanky-Muller) estejam envolvidas na manutenção da integridade de *A. comata*, *A. caudata* e *A. kertesziae*.

Abstract

Aechmea is recognized as the largest and most problematic taxonomically genus within subfamily Bromelioideae (Bromeliaceae), presenting great morphological, reproductive and vegetative variability. A recent study involving species of *Aechmea* subgenus *Ortgiesia* detected a putative hybrid between *Aechmea comata* (Gaudich.) Baker and *A. caudata* Lindm. In the same study, *A. comata* and *A. kertesziae* Reitz showed plastid haplotype sharing, which could be due to retention of ancestral polymorphism, occurrence of hybridization or even due the fact that these species are the same taxa, as the delimitation using morphology is challenging. These three species overlap in flowering time, share one pollinator, and are found in sympatry (*A. comata* and *A. caudata*) (*A. comata* and *A. kertesziae*) in the Santa Catarina Island. Therefore, the objective of this study was to investigate the taxonomic delimitation and hybridization among these three species. To do so, we used ten nuclear (nuSSR) and six plastid (cpSSR) microsatellite markers, morphological and ecological data, as well as controlled pollination experiments. We sampled 244 individuals belonging to the three species from four allopatric populations and four sympatric populations. Bayesian analyses indicated that each species present a distinct genetic profile, although hybrids have been identified by molecular analyzes. *Aechmea comata* has demonstrated the highest genetic diversity already reported for bromeliads. The hybrids identified by Structure analyses did not show intermediate morphology, making difficult their identification in nature. The morphological and ecological data support the molecular data that *A. comata*, *A. caudata*, and *A. kertesziae* are distinct entities. *Aechmea kertesziae* presents overlapping morphological features with *A. comata* and *A. caudata*, due to great intraspecific variability. Ecological analysis has demonstrated that the three species have different preferences of microhabitat. Artificial crosses data confirmed the reproductive compatibility between *A. comata* with *A. caudata* and with *A. kertesziae*. It is likely that a set of prezygotic barriers as phenological and ethological isolation, self-compatibility, and perhaps postzygotic barriers, as low viability or sterility of hybrids, postzygotic Bateson-Dobzhanky-Muller incompatibilities are involved in maintaining species integrity of *A. comata*, *A. caudata*, and *A. kertesziae*.

Capítulo I
Introdução Geral



Aechmea comata

Introdução Geral

1 Família Bromeliaceae

Bromeliaceae é uma das grandes famílias de angiospermas monocotiledôneas quase exclusivamente neotropical, estendendo-se desde o sul da América do Norte, passando pela América Central até chegar a Patagônia (Argentina) na América do Sul (Smith & Downs, 1979; Wanderley & Martins, 2007). Apenas uma espécie, *Pitcarnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr. ocorre no oeste da África. Os membros dessa família são ervas ou raramente arbustos perenes (*Deuterocohnia* Mez), terrestres, saxícolas ou epífitas, de poucos centímetros de comprimento (*Tillandsia* L.) até lenhosas de grande porte, podendo ultrapassar 10 m de altura (*Puya* Molina). Apresentam caule curto encoberto pelas folhas em roseta ou mais raramente caule desenvolvido (*Orthophytum* Beer), estolão algumas vezes presente; raízes absorventes nas plantas terrestres ou fixadoras nas epífitas, raramente ausente (*Tillandsia usneioides* L.) (Smith & Downs, 1974, 1979; Wanderley & Martins, 2007). São conhecidas popularmente como bromélias ou por designações de origem indígena, dependendo da região do Brasil como: caraguatá, caraguataí, caraguatatuba (sudeste), gravatazinho, gravatá-açú (nordeste), gravataí (sul), gravatá, gravatal, gravatás (nordeste, sudeste e sul) (Reitz, 1983).

As bromélias são ecologicamente diversas, podendo ser encontradas em uma grande variedade de habitats, como florestas, margens de rios, afloramentos rochosos e áreas arenosas. Embora a família Bromeliaceae concentre-se mais em habitats áridos do que úmidos, um substancial número de espécies terrestres são sujeitas a inundações sazonais (espécies reófitas). Espécies dos gêneros *Guzmania* Ruiz & Pav., *Pitcairnia* L'Her. e *Dyckia* Schult. f. já foram identificadas como espécies reófitas (Smith & Downs, 1979; Benzing, 2000). Devido a essa abrangente variedade de habitats, os membros dessa família desempenham um importante papel ecológico com a fauna local, servindo como fonte de alimento (brotos, frutos carnosos, folhas, pólen, néctar, escapo da inflorescência), água (acumulada nos tanques formados pelas folhas), abrigo, local para alimentação e/ou desova para diversas espécies de animais (anfíbios, insetos, pequenos mamíferos, répteis, aracnídeos e crustáceos) (Benzing, 2000).

Diversas espécies de bromélias são apreciadas para várias finalidades de interesse

humano, tais como: plantas alimentícias: *Ananas comosus* (L.) Merr. (abacaxi), bagas de algumas espécies (*Aechmea nudicaulis* var. *cuspidata* Baker, *Aechmea kertesziae* Reitz e *Aechmea comata* Baker) são consumidas por comunidades locais e conhecidas popularmente como chupa-chupa; plantas medicinais: *Bromelia antiacantha* Bertol. (banana-do-mato), *Tillandsia usneioides* (barba-de-velho), *T. stricta* Sol. ex Sims (cravo-do-mato), *A. comosus* (abacaxi); cerca vivas divisórias contra o gado: *Ananas bracteatus* Schult. f., *Ananas fritzmuelleri* Camargo, *B. antiantha*, *Aechmea ornata* Baker, *Dyckia encholirioides* (Gaudich.) Mez. e var. *rubra* (Wittm.) Reitz; plantas ornamentais e decorativas: várias espécies são de interesse econômico devido ao apelo ornamental (*Aechmea distichantha* Lem., *Alcantarea imperialis* Harms, *Vriesea gigantea* Gaudich.), e outras possuem utilidades específicas, como por exemplo, *B. anticantha* da qual extrai-se ótima fibra para muitos fins industriais como cordoaria e *T. usneiodes* da qual produz-se crina vegetal própria para acolchoados. Já espécies dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Catopsis* Griseb., *Pitcairnia*, *Tillandsia* e *Vriesea* Lindl. são utilizadas em rituais místicos, funerais e cerimônias de casamento em alguns países da América do Sul (Reitz, 1983; Benzing, 2000).

Atualmente Bromeliaceae conta com 3510 espécies distribuídas em 59 gêneros (Gouda cont. atual.). No Brasil, essa família é amplamente distribuída, sendo uma das dez famílias mais diversas do país. Estima-se que cerca de 70% dos gêneros e 40% das espécies ocorram no território brasileiro, com uma taxa de endemismo de 85,3%, além de ser a terceira família mais diversa do domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (Wanderley & Martins, 2007; Forzza *et al.*, 2010). A família apresenta quatro centros de diversidade em regiões montanhosas, incluindo América Central, os Andes, os Tepuis no Escudo das Guianas e a Serra do Mar, além das faixas costeiras do Escudo Brasileiro na América do Sul (Wanderley & Martins, 2007; Givnish *et al.*, 2011). No *checklist* realizado por Martinelli *et al.* (2008), os estados da região sudeste e o sul da Bahia abrigaram mais da metade das espécies inventariadas (407 espécies), ficando evidente que esta região é o principal centro de diversidade e endemismo da família no domínio da Mata Atlântica. Nesse domínio foi registrado um total de 31 gêneros, 803 espécies e 150 táxons infraespecíficos. Dez gêneros (*Andrea* Mez, *Canistropsis* (Mez) Leme, *Canistrum* E.Morren, *Edmundoa* Leme, *Fernseea* Baker, *Lymania* Read, *Nidularium* Lem., *Portea* K.Koch, *Quesnelia* Gaudich. e *Wittrockia* Lindm.) e 653 espécies são endêmicos da Mata Atlântica brasileira (Martinelli *et al.*, 2008).

1.1 Evolução e Filogenia da Família Bromeliaceae

Estudos realizados por Givnish *et al.* (2004, 2007, 2011, 2014), indicam que a família Bromeliaceae surgiu no Escudo das Guianas no norte da América do Sul, há 100 milhões de anos (Ma), em regiões com altitude inferior a 500 m. O ancestral das bromélias provavelmente tinha um hábito terrestre, não formador de tanque, polinizado por insetos, sementes aladas, via fotossintética C3 e foi adaptado a condições de várzea úmida em areias ou arenitos inférteis no Escudo das Guianas.

A presença de tricomas exclusivos nas folhas capazes de absorver água, e o desenvolvimento de várias estratégias para lidar com o estresse hídrico (suculência, presença de tanque, fotossíntese CAM - metabolismo ácido das crassuláceas), são características responsáveis pela diversificação das linhagens em Bromeliaceae e pela grande versatilidade ecológica da família (Benzing, 2000; Horres *et al.*, 2007; Heller *et al.*, 2015). *Hechtia* Klotzsch e representantes da subfamília Tillandsioideae representam as primeiras invasões de bromélias na região neotropical fora do Escudo das Guianas (Givnish *et al.*, 2007).

As linhagens modernas de bromélias (subfamílias existentes) apenas começaram a divergir umas das outras há aproximadamente 19 Ma, com subseqüentes invasões de áreas periféricas mais secas na América Central e no norte da América do Sul. O surgimento da maioria da diversidade atual de bromélias, incluindo, Tillandsioideae, Bromelioideae e os grandes gêneros *Pitcairnia*, *Navia* Schult. f., *Hechtia*, *Dyckia*, e as linhagens modernas de *Puya*, surgiram há 15 Ma. A dispersão à longa distância para o oeste da África tropical (*P. feliciana*) foi relativamente recente, em torno de 10 Ma. O longo período entre o surgimento de Bromeliaceae e a divergência das linhagens modernas a partir de outras, implica que muitas espécies foram extintas ao longo da história evolutiva dessa família (Givnish *et al.*, 2004, 2007, 2011).

A monofilia da família Bromeliaceae e sua coesão taxonômica tem sido fortemente suportada, tanto por dados morfológicos como moleculares (Terry *et al.*, 1997; Crayn *et al.*, 2004; Givnish *et al.*, 2004, 2007, 2011). A família foi tradicionalmente dividida em três subfamílias baseado em características morfológicas: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979). Entretanto, a subfamília Pitcairnioideae apresentava-se amplamente parafilética em estudos filogenéticos, apesar da monofilia de Bromelioideae e Tillandsioideae (Terry *et al.*, 1997; Crayn *et al.*, 2004; Givnish *et al.*, 2004,

2007), evidenciando a classificação artificial tradicionalmente adotada para as subfamílias de Bromeliaceae. Baseado na reconstrução filogenética para a família utilizando o gene plastidial *ndhF* (*NADH desidrogenase F*) Givnish *et al.* (2007), propuseram que a subfamília Pitcairnioideae fosse subdividida em cinco novas subfamílias, todas sendo linhagens monofiléticas e morfologicamente distintas de Bromelioideae e Tillandsioideae. Posteriormente, Givnish *et al.* (2011), através de um consórcio internacional, produziram a filogenia mais abrangente e fortemente suportada para Bromeliaceae até o momento, com oito marcadores plastidais e 46 gêneros dos 59 descritos, confirmando a monofilia das subfamílias propostas por Givnish *et al.* (2007), estabelecendo assim oito subfamílias dentro de Bromeliaceae: Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae, Navioideae, Hechtioideae, Tillandsioideae, Lindmanioideae e Brocchinioideae.

1.2 Subfamília Bromelioideae

A subfamília Bromelioideae contém 33 gêneros e 936 espécies (Luther, 2012), tendo como centro de diversidade o leste e sudeste do Brasil (Horres *et al.*, 2007). Compreende ervas na maioria epífitas, geralmente acaules com raízes em geral funcionando apenas como fixadoras, folhas rosuladas ou fasciculadas, comumente serrilhadas, fruto tipo baga muitas vezes seco, indeiscente e sementes nuas (Smith & Downs, 1979). Os membros da subfamília são encontrados em toda a região neotropical, existindo em todos os tipos de biomas tropicais, das dunas de areias abertas à florestas úmidas de altitude (Sass & Specht, 2010).

Dentro de Bromelioideae as espécies são atribuídas aos gêneros principalmente com base em características florais, com uma grande divisão feita entre espécies que possuem sépalas simétricas vs assimétricas (Smith, 1988 *apud* Sass & Specht, 2010). Vários caracteres são únicos dessa subfamília, incluindo a presença de espinhos nas margens das folhas, ovários inferiores ou quase inferiores e frutos carnosos e indeiscentes (Smith & Downs, 1979). Entretanto, estudos que usam apenas a análise morfológica não têm sido suficientes para resolver os relacionamentos infragenéricos dentro de Bromelioideae (Evans *et al.*, 2015).

Smith & Downs (1979), separaram muitos gêneros dentro de Bromelioideae usando a presença ou ausência de apêndices de pétalas, e notaram explicitamente que sua classificação dos gêneros foi artificial. Schulte & Zizka (2008), através da abordagem de

reconstrução da evolução desse carácter, demonstraram que os apêndices nas pétalas tiveram várias origens independentes dentro da família, bem como dentro de Bromelioideae, evidenciando que o carácter é homoplásico, e assim, inapropriado para delimitação genérica dentro da subfamília. Isto ocorre, em grande parte, devido à alta variação existente na morfologia, ecologia e fisiologia da subfamília, tornando o reconhecimento de homoplasias difícil (Schulte & Zizka, 2008).

A delimitação genérica dentro da subfamília é considerada como especialmente problemática porque geralmente depende de poucos caracteres de valor sistemático incerto. Frequentemente as características morfológicas utilizadas na taxonomia exibem altos níveis de homoplasia, falhando em delimitar grupos naturais, pois vários são os gêneros que são definidos por combinações únicas de caracteres, em vez de sinapomorfias tradicionais (Faria *et al.*, 2004a; Horres *et al.*, 2007; Schulte & Zizka, 2008; Schulte *et al.*, 2009). Embora urgentemente necessário, um conceito genérico atualizado para a subfamília não está disponível, principalmente devido as incertezas sobre o valor taxonômico de caracteres morfológicos (Schulte & Zizka, 2008).

1.3 Evolução e Filogenia da subfamília Bromelioideae

Depois que Bromeliaceae originou-se no Escudo das Guianas, o ancestral de *Puya*/Bromelioideae espalhou-se a oeste do norte dos Andes e a partir desse local para o sul ao longo da Cordilheira dos Andes. Essas plantas eram terrestres, adaptadas à condições úmidas e possuíam via fotossintética C3. Uma separação inicial na linha central Andina levou ao gênero *Greigia* Reg. No sul dos Andes, linhagens de plantas terrestres, adaptadas a habitats mais úmidos e com sombra, também com via fotossintética C3, e sem a presença de tanque, foram capazes de colonizar habitats abertos, semiáridos e áridos, dando origem aos gêneros chilenos endêmicos *Fascicularia* Mez e *Ochagavia* Phil. e também aos gêneros *Deinacanthon* Mez e *Bromelia* L. Do sul dos Andes, Bromelioideae alcançou o leste do Brasil, onde a radiação levou ao recente centro de diversidade da subfamília, especialmente na Mata Atlântica (Schulte *et al.*, 2005).

A monofilia de Bromelioideae com *Puya* Molina como grupo irmão vem sendo demonstrada em vários trabalhos (Terry *et al.*, 1997; Crayn *et al.*, 2004; Givnish *et al.*, 2004, 2007, 2011; Schulte *et al.*, 2005, 2009; Horres *et al.*, 2007; Schulte & Zizka, 2008; Silvestro

et al., 2014; Evans *et al.*, 2015; Heller *et al.*, 2015). Givnish *et al.* (2007, 2011), hipotetizaram que o ancestral comum de *Puya* e Bromelioideae surgiu há cerca de 13,4 Ma nos Andes, e a divergência dessas duas linhagens ocorreu há aproximadamente 10 Ma, com *Puya* diversificando ao longo dos Andes e Bromelioideae invadindo o Escudo Brasileiro logo após a divergência, via dispersão a partir dos Andes. Jabaily & Sytsma (2010), hipotetizaram a origem da subfamília Bromelioideae no Chile Central, baseado na distribuição chilena de ambas linhagens basais de Bromelioideae e os primeiros clados divergentes de *Puya*.

A filogenia dos gêneros da subfamília ainda apresenta uma baixa resolução, mas pode-se identificar as linhagens basais *Bromelia*, *Greigia*, *Fascicularia*, *Ochagavia*, *Deinacanthon*, formando o clado Eu-Bromelioideae. Um segundo clado, “core bromelioids” é observado, que compreende a maioria das espécies da subfamília, sendo quase exclusivamente composto por espécies de hábito epífita, formadoras de tanque e com a via fotossintética CAM (Schulte *et al.*, 2005, 2009; Schulte & Sizka, 2008; Givnish *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2015). Schulte *et al.* (2005), sugerem que o clado “core bromelioids” teve uma rápida radiação devido a baixa variação em marcadores plastidiais, que provavelmente foi favorecida pela invasão bem sucedida em habitats epífitos.

O clado “core bromelioids” é bastante jovem, com uma idade estimada de cerca de 7 Ma, que corresponde ao final do Mioceno (Silvestro *et al.*, 2014). Este clado passou por uma rápida diversificação, especialmente dentro da Mata Atlântica do sudeste do Brasil, sendo que o tipo de mudança cíclica na distribuição de habitat ótimo, como ocorreu no Plioceno, poderia explicar a homoplasia morfológica nesse clado, levando às atuais dificuldades taxonômicas (Givnish *et al.*, 2004, 2007; Schulte *et al.*, 2009; Sass & Specht, 2010). As relações filogenéticas dentro do “core bromelioids” são ainda pobremente entendidas, e revisões taxonômicas, bem como estudos moleculares baseados em uma amostragem robusta, são necessários, especialmente para os grandes gêneros. Vários desses não são monofiléticos, particularmente *Aechmea* e gêneros próximos. Isto ocorre principalmente devido ao alto nível de homoplasia morfológica observada, que torna o reconhecimento de grupos naturais, baseado em caracteres morfológicos, difícil. Sendo assim, até o momento, estudos moleculares forneceram apenas conhecimentos limitados das relações inter e infragenéricas no “core bromelioids”, devido à limitada amostragem e baixa resolução de reconstruções filogenéticas (Schulte *et al.*, 2005, 2009; Horres *et al.*, 2007; Schulte & Zizka,

2008; Sass & Specht, 2010; Heller *et al.*, 2015).

1.4 Gênero *Aechmea* e sua problemática taxonômica

Aechmea é o maior gênero da subfamília Bromelioideae, possuindo grande variabilidade morfológica, reprodutiva e vegetativa (Faria *et al.*, 2004b). Atualmente esse gênero possui 282 espécies (Gouda *et al.*, cont. atual.), distribuídas desde o México e Antilhas até o Uruguai e Norte da Argentina (Reitz, 1983). Apesar da ampla distribuição, *Aechmea* apresenta dois importantes centros de diversidade na Mata Atlântica. O primeiro em Pernambuco e Alagoas e outro entre a Bahia e o Rio de Janeiro (Martinelli *et al.*, 2008). O Brasil conta com cerca de 160 espécies que ocorrem nos mais diversos ambientes, desde as florestas pluviais até os mais áridos, como as caatingas nordestinas (Wanderley & Martins, 2007).

As espécies do gênero *Aechmea* são ervas perenes, na maior parte acaules, de estatura média, frequentemente propagando-se por rizomas basais. Folhas em roseta densa ou fasciculadas, com as bainhas formando tanques, geralmente espinhoso-serradas (Smith & Downs, 1979; Reitz, 1983). Smith & Downs (1979), propuseram oito subgêneros para *Aechmea*: *Aechmea* Mez, *Chevaliera* (Gaudich. ex Beer) Baker, *Lamprococcus* (Beer) Baker, *Macrochordion* (de Vriese) Baker, *Ortgiesia* (Regel) Mez, *Platyaechmea* (Baker) Baker, *Podaechmea* Mez e *Pothuava* Baker (Baker), baseados principalmente nas características de tipo de inflorescência (simples ou composta), tipo de flores (sésseis ou pediceladas), simetria das sépalas e morfologia dos apêndices petalíneos. Essas características não são muito consistentes, tornando os limites entre esses subgêneros nem sempre muito evidentes. Observam-se algumas vezes espécies mal posicionadas no respectivo subgênero ou mesmo no próprio gênero *Aechmea* (Wanderley & Martins, 2007). Como tal, *Aechmea* e seus oito subgêneros atualmente reconhecidos são centros de grandes desacordos a respeito da delimitação genérica e infragenérica dentro de Bromelioideae (Canela *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2004b).

Muitos dos caracteres usados para atribuir espécies dentro de *Aechmea* são os mesmos utilizados para especificar espécies pertencentes a outros gêneros, confundindo as delimitações taxonômicas (Faria *et al.*, 2004a). Estes caracteres incluem ramificação da inflorescência, características de sépala e pétala, tipo de abertura do grão de pólen, presença

ou ausência de pedicelos e morfologia da bráctea floral (Schulte & Zizka, 2008; Sass & Specht, 2010). A sistemática infragenérica do gênero é considerada artificial e pobremente entendida. As discordantes classificações no gênero têm surgido porque os taxonomistas têm enfatizado apenas poucos caracteres e o conhecimento de muitos dados diagnósticos potencialmente úteis, como por exemplo: morfologia do fruto, semente e floral é limitado, e frequentemente estão inacessíveis em material de herbário e, assim, a variabilidade é pobremente entendida. A maioria dos caracteres tradicionalmente enfatizados em tratamentos taxonômicos de *Aechmea* mostram considerável homoplasia e frequentemente falham na delimitação de grupos naturais (Faria *et al.*, 2004a; 2010).

A maioria dos subgêneros de *Aechmea* não correspondem a grupos monofiléticos. Dados de DNA plastidial não suportam a monofilia de qualquer um dos subgêneros de *Aechmea* (com exceção de *Podaechmea* que não foi analisado até o momento) (Evans *et al.*, 2015). *Aechmea* com seus oito subgêneros representa quase um terço das espécies em Bromelioideae e incorpora uma porção substancial das dificuldades taxonômicas dentro da subfamília (Evans *et al.*, 2015). Smith & Downs (1979), reconheceram que o gênero é provavelmente polifilético, mas a falta de caracteres morfológicos confiáveis dentro do grupo e entre seus subgêneros segregados tem impedido o progresso da sistemática (Evans *et al.*, 2015).

Aechmea é reconhecido como o maior e mais problemático gênero em Bromelioideae e dentro do clado “core bromelioids”, sendo que vários estudos filogenéticos evidenciam sua natureza polifilética (Faria *et al.*, 2004a; Schulte *et al.*, 2005, 2009; Horres *et al.*, 2007; Schulte & Zizka, 2008; Sass & Specht, 2010; Givnish *et al.*, 2011; Silvestro *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015, Heller *et al.*, 2015). O gênero tem uma significativa contribuição para politomia dentro de Bromelioideae. Espécies de *Aechmea* são encontradas em clados contendo elementos de numerosos outros gêneros, incluindo *Billbergia* Thunb., *Canistrum*, *Hohenbergia* Schult.f., *Quesnelia* e *Ronnbergia* E.Morren & André (Evans *et al.*, 2015). A grande problemática taxonômica presente em *Aechmea* indica que sua definição atual é altamente polifilética e necessitará ser extensivamente redefinida (Faria *et al.*, 2004a; 2010; Horres *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2015).

1.5 Subgênero *Ortgiesia*

O subgênero *Ortgiesia* é composto por 20 espécies de distribuição restrita a América do Sul. A maioria das espécies desse subgênero ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil, no domínio da Mata Atlântica, com apenas duas espécies ocorrendo também no leste da Argentina (*Aechmea calyculata* (E. Morren) Baker) e no noroeste do Uruguai e região leste da Argentina e Paraguai (*Aechmea recurvata* (Klotzsch) L. B. Sm.) (Smith & Downs, 1979; Goetze *et al.*, 2016). As características utilizadas para estabelecer os membros desse subgênero são: brácteas florais decorrentes, flores sésseis, sépalas conadas de 1/3 até metade de seu comprimento, com mucron tão longo quanto o lobo livre e pétalas com apêndices distintos (Smith & Downs, 1979). A maior riqueza de espécies de *Ortgiesia* é encontrada entre as latitudes 26° e 27°S (estado de Santa Catarina), que corresponde a fitofisionomia de floresta ombrófila, localizada principalmente na costa brasileira, evidenciando que o sul da Mata Atlântica é o centro de diversidade do subgênero. O número de espécies pertencentes à *Ortgiesia* encontradas em outras fitofisionomias diminui com o aumento da distância a partir da linha da costa devido possivelmente ao fato de serem áreas que recebem uma menor quantidade de chuva (Goetze *et al.*, 2016).

Dentro do “core bromelioids”, são encontrados vários clados altamente suportados, como por exemplo o clado unificando os representantes de *Aechmea* subgênero *Ortgiesia*. Em alguns estudos *Aechmea* subgênero *Ortgiesia* é recuperado como monofilético (Horres *et al.*, 2007; Schulte & Zizka, 2008; Silvestro *et al.*, 2014) e em outros moderadamente suportado (Schulte *et al.*, 2009) ou parafilético (Sass & Sepcht, 2010; Evans *et al.*, 2015). Recentemente, Goetze *et al.* (2016), analisaram as relações infragenéricas de *Ortgiesia* utilizando marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e abrangendo 14 espécies do subgênero. Os autores concluem que *Ortgiesia* é um grupo natural, embora apenas três das 14 espécies incluídas foram recuperadas como linhagens monofiléticas, e somente *A. recurvata* recebeu suporte estatístico nas filogenias. Até o momento, as relações filogenéticas dentro do subgênero permanecem incertas, devido principalmente a recente diversificação das espécies e da ocorrência de retenção de polimorfismo ancestral e hibridação (Goetze *et al.*, 2016).

Silvestro *et al.* (2014), através de uma reconstrução filogenética para subfamília Bromelioideae utilizando marcadores plastidiais e uma região nuclear, demonstraram que a diversificação de *Aechmea* subgênero *Ortgiesia* começou há aproximadamente 2,5 Ma, que

corresponde a época do Plioceno/Pleistoceno. Goetze *et al.* (2016), sugerem um cenário de recente diversificação para o subgênero no sul da Mata Atlântica, baseado no fato de que a maioria das espécies ocorrem no sul, bem como muitas são endêmicas ou estritamente endêmicas dessa região. Devido à recente diversificação de *Ortgiesia*, sugere-se que as oscilações climáticas do Pleistoceno, que afetaram a distribuição de espécies da Mata Atlântica, restringindo sua ocorrência a pequenas áreas de refúgio, poderiam ter fragmentado a distribuição das espécies do subgênero, explicando o atual padrão de distribuição geográfico encontrado (Goetze *et al.*, 2016).

A maioria das espécies de *Aechmea* subgênero *Ortgiesia* possuem pétalas amarelas (sete espécies) ou pétalas azuis (seis espécies). *Aechmea recurvata* possui pétalas rosa e *A. candida* E. Morren ex Baker pétalas brancas. Na taxonomia do subgênero, as características florais são principalmente enfatizadas, em particular o tipo de inflorescência (simples ou composta, laxa ou densa), cor das pétalas (amarela, azul, rosa ou branca) e sépalas (vermelha, azul, amarela, rosa, púrpura ou branca), tamanho das flores, brácteas florais, sépalas e pétalas, forma da inflorescência (elipsoide, paniculada, piramidal, bipinada, subpiramidal ou cilíndrica), cor, tamanho e tipo de ovário. Observa-se que a maioria das espécies desse subgênero possuem sépalas assimétricas (Smith & Downs, 1979).

Apesar das características taxonômicas atribuídas por Smith & Downs (1979), a princípio delimitarem as espécies de *Ortgiesia*, ocorre uma grande variação morfológica dessas características na natureza, principalmente na coloração das sépalas, forma e tipo de inflorescência, dificultando as delimitações taxonômicas (L. M. S. Costa, observação pessoal; Abondanza, 2012; Goetze, 2014). A sobreposição de caracteres tais como tipo de inflorescência, comprimento das flores, comprimento e largura das folhas e plasticidade morfológica dentro de uma mesma população, além da sobreposição do período de florescimento, foram evidenciados por Abondanza (2012) como fatores limitantes para a delimitação taxonômica de três espécies do complexo *Aechmea coelestis* (*A. coelestis* (K. Koch) E. Morren, *A. gracilis* Lindm. e *A. organensis* Wawra), pertencentes ao subgênero *Ortgiesia*.

Goetze *et al.* (2016), avaliaram a utilidade de três caracteres morfológicos tradicionalmente empregados nas delimitações taxonômicas de *Ortgiesia*, cor da pétala (amarela, azul, rosa ou branca), tipo de inflorescência (simples ou composta) e forma da

inflorescência (elipsoide, subcilíndrica, cilíndrica ou piramidal) através da abordagem de reconstrução de carácter na filogenia desse subgênero, demonstrando que os três caracteres são de limitado valor taxonômico devido a homoplasia. Altos níveis de homoplasia em caracteres usados para distinguir espécies de *Aechmea* foram previamente observados nos estudos filogenéticos baseados em caracteres morfológicos por Faria *et al.* (2004a, 2004b), o que pode ser considerado uma consequência da rápida diversificação tanto do clado “core bromelioids” quanto do próprio subgênero *Ortgiesia* (Silvestro *et al.*, 2014).

1.6 *Aechmea comata*, *A. caudata* e *A. kertesziae*

Morfológicamente dois grandes grupos de espécies podem ser identificados em *Ortgiesia*: um de flores com pétalas amarelas, com distribuição geográfica restrita ao sul do Brasil, com exceção de *A. caudata* Lindm. que ocorre também no estado de São Paulo; e outro de flores com pétalas azuis. As espécies do subgênero *Ortgiesia* com pétalas amarelas são: *Aechmea blumenavii* Reitz, *A. calyculata*, *A. caudata*, *A. comata*, *A. kleinii* Reitz, *A. kertesziae* e *A. winkleri* Reitz (Smith e Downs, 1979). Dessas espécies, três foram investigadas no presente trabalho:

Aechmea comata

É uma erva epífita, rupícola ou terrestre de cerca de 50 cm de altura, estolonífera com poucas folhas dispostas em roseta tubular. Possui inflorescência densa, simples (cilíndrica ou elipsoide) multifloral, um pouco mais alta do que as folhas, flores sésses com sépalas róseas e pétalas citrinas (Figura 1). Quanto ao hábito lembra *A. blumenavii* e *A. kertesziae* (sobretudo as formas heliófilas) com as quais vegetativamente pode ser confundida (Smith & Downs, 1979; Reitz, 1983). A distribuição dessa espécie é descrita como irregular e descontínua nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde ocorre como rupestre ou terrícola na restinga e geralmente, como epífita, no interior das florestas. Encontra-se praticamente desde o nível do mar (restinga) até 400 m de altitude nas florestas das encostas, situadas próximas à costa (Reitz, 1983). Entretanto, de acordo com registros atuais de herbário (speciesLink: <http://www.splink.org.br>), a espécie é encontrada somente na ilha de Santa Catarina e regiões continentais próximas. *Aechmea comata* possui registros de florescimento para os meses de julho, setembro e novembro (Reitz, 1983), entre os meses de

agosto e novembro (Lenzi *et al.*, 2006; Dorneles *et al.*, 2011), além da segunda quinzena de janeiro até a primeira de fevereiro, segunda quinzena de maio, junho e julho (Lenzi *et al.*, 2006).

Lenzi *et al.* (2006), relataram que *A. comata* apresenta padrões fenológicos distintos conforme o ambiente que se encontra, possivelmente associados à adequações ambientais. A estratégia de floração de *A. comata* em área de baixa intensidade luminosa (sub-bosque) é do tipo disponibilidade regular, logo existe uma produção de poucas flores por dia durante um longo período (Lenzi *et al.*, 2006; Dorneles *et al.*, 2011). Contudo, a floração nos agrupamentos heliófilos (restinga herbácea) pode ser enquadrada como do tipo “*multiple bang*”, pois apresenta múltiplos períodos de floração ao longo de todo o ano (Lenzi *et al.*, 2006). Abelhas da espécie *Bombus morio* Swederus (Apidae) e do gênero *Euglossa* Latreille (Apidae), além das borboletas do gênero *Heliconius* Kluk (Heliconiidae), são consideradas potenciais polinizadores para *A. comata*. Entretanto, beija-flores das espécies *Amazilia fimbriata* Elliot (Trochilinae) e *Thalurania glaucopis* Gmelin (Trochilinae) são polinizadores frequentes e efetivos (Lenzi *et al.*, 2006; Dorneles *et al.*, 2011). *Aechmea comata* foi descrita com distintos sistemas de cruzamento. De acordo com Lenzi *et al.* (2006), *A. comata* é autocompatível, enquanto que Dorneles *et al.* (2011), a descreveram como autoincompatível.



Figura 1. A) Dois indivíduos de *Aechmea comata* em período reprodutivo. B) Detalhe da inflorescência da espécie. Fotos: Christian Rohr e Renata Ruas, respectivamente.

Recentes estudos observaram que *A. comata* apresenta variação morfológica no

tamanho e forma do corpo conforme a intensidade luminosa a qual é exposta. As folhas são mais curtas, largas e coriáceas nos indivíduos heliófilos (expostos à alta intensidade luminosa), enquanto nos indivíduos esciófilos (expostos à baixa intensidade luminosa) apresentam-se mais alongadas, estreitas e membranáceas (Lenzi *et al.*, 2006; Voltolini, 2009). Além da plasticidade morfológica encontrada no corpo vegetativo dessa espécie de acordo com a incidência solar, Voltolini (2009), relatou que o comprimento da folha apresenta-se distinto entre diferentes formas de vida (terrícola, rupícola e epífita). Apesar dessa grande variação morfológica no corpo vegetativo de *A. comata* dependente do ambiente onde cresce, as características reprodutivas como comprimento da inflorescência, tamanho do botão floral, comprimento e largura da corola, comprimento do cálice e número de flores por inflorescência não variam nos ambientes de alta e baixa luminosidade solar (Lenzi *et al.*, 2006).

Aechmea caudata

É uma planta epífita ou rupícola de 25 a 75 cm de altura, com poucas folhas dispostas em uma roseta funiliforme. Possui inflorescência paniculada em forma de cone com flores sésseis de pétalas amarelas e sépalas vermelhas (Figura 2). Característica e exclusiva da floresta pluvial da encosta atlântica onde apresenta uma vasta distribuição. É uma espécie esciófita ou de luz difusa, mais raramente heliófita, onde desenvolve-se no interior das florestas primárias preferencialmente fixada em troncos de árvores. Ocorre praticamente desde o nível do mar (50 m) até 800 m de altitude em florestas de terreno bastante movimentado. *Aechmea caudata* apresenta uma distribuição ampla, ocorrendo desde os estados de São Paulo até o Rio Grande do Sul (Goetze, 2010). O florescimento da espécie foi registrado para os meses de dezembro e janeiro (Reitz, 1983), entre os meses de março e junho e entre agosto e outubro (Kamke, 2009). Aparentemente, indivíduos heliófilos da espécie não apresentam um período definido de floração, diferentemente do observado para indivíduos esciófilos. A espécie de abelha *Bombus morio* representa o único agente polinizador efetivo de *A. caudata*, apesar de existirem vários visitantes florais como, beija-flores e outras espécies de abelhas, que não promovem a formação de frutos com sementes. *Aechmea caudata* é uma espécie de fecundação cruzada obrigatória, sendo autoincompatível (Kamke *et al.*, 2011).



Figura 2. A) Indivíduo de *Aechmea caudata*. B) Detalhe da inflorescência. Pode-se verificar a variação morfológica da inflorescência encontrada nessa espécie. Fotos: Christian Rohr.

Aechmea kertesziae

É uma erva epífita ou rupícola, estolonífera de 40 a 80 cm de altura ou mais, com cerca de 20-25 folhas dispostas em uma densa roseta funiliforme. A inflorescência é em forma de espiga simples, elipsoide até cilíndrica, multifloral, com 40 a 100 flores sésseis com pétalas amarelas e sépalas róseas (Figura 3). Característica e exclusiva da zona da Floresta Pluvial Atlântica, onde apresenta restrita e pouco expressiva dispersão. É uma espécie heliófila ou de luz difusa que ocorre principalmente na vegetação arbustiva da restinga como rupícola ou epífita, frequentemente como rupestre nos costões rochosos e menos frequentemente como epífita no interior das florestas das encostas, em altitudes compreendidas entre 5 a 350 m sobre o nível do mar. *Aechmea kertesziae* apresenta distribuição restrita ao estado de Santa Catarina, ocorrendo desde o Vale do Itajaí até Laguna, não chegando até o estado do Rio Grande do Sul (Reitz, 1983). O florescimento da espécie foi relatado para os meses de abril e entre julho e novembro (Reitz, 1983). *Aechmea kertesziae* é polinizada por insetos (M. Büttow, comunicação pessoal) e é autoincompatível (Capra, 2012).



Figura 3. A) Indivíduo de *Aechmea kertesziae*. B) Detalhe da inflorescência. Fotos: Christian Rohr.

2 Conceitos de espécie

A questão da delimitação de espécies tem sido confundida por um problema envolvendo o próprio conceito de espécie. Atualmente, diferentes subgrupos de biólogos defendem diferentes, e no mínimo parcialmente incompatíveis, conceitos de espécie, podendo conduzir a diferentes conclusões sobre os limites e número destas (de Queiroz, 1998, 1999, 2005a, 2005b, 2005c, 2007). A razão para essas incompatibilidades decorre das diferentes propriedades biológicas sobre as quais vários dos conceitos alternativos de espécie são baseados, por exemplo, o isolamento reprodutivo intrínseco no caso do conceito biológico; ocupação de um nicho distinto ou zona adaptativa no caso do conceito ecológico; grupos fenéticos distintos sob o conceito fenético, diferenças de estado de caracteres fixos no caso da versão diagnosticável do conceito filogenético de espécie e outros conceitos adotam, ainda, outras propriedades secundárias (de Queiroz, 1998, 1999, 2005a, 2007).

No conceito unificado de espécie, espécies são definidas como linhagens de metapopulação evoluindo separadamente, ou mais especificamente, como segmentos de tais linhagens. O termo linhagem refere-se a uma série ancestral-descendente, enquanto o termo metapopulação refere-se a uma população inclusiva composta de subpopulações conectadas (de Queiroz, 1998, 1999, 2005a, 2005b, 2005c, 2007). Todas as outras propriedades que têm

sido previamente consideradas propriedades adicionais de espécie são reinterpretadas como contingentes ao invés de propriedades necessárias de espécie, isto é, como propriedades que uma espécie pode ou não adquirir durante o curso de sua existência. Nem todas as espécies possuem todas as propriedades, embora muitas delas são adquiridas por numerosas espécies durante o processo de especiação. Assim, algumas espécies são reprodutivamente isoladas, algumas são monofiléticas, outras ocupam diferentes zonas adaptativas e muitas possuem várias combinações dessas e outras propriedades (de Queiroz, 1999; 2005c). No contexto de um conceito unificado de espécie qualquer propriedade que fornece evidência da separação de linhagem é relevante para inferir os limites e número de espécies (de Queiroz, 2007).

Mesmo uma única propriedade relevante fornece tal evidência, embora seja necessário múltiplas linhas de evidências para corroborar essa hipótese. Por outro lado, a ausência de qualquer uma ou mais das propriedades em questão não constitui evidência contradizendo uma hipótese de separação de linhagens. A razão disso é que a linhagem pode simplesmente não ter evoluído ainda as propriedades, como esperado se ela ainda está nos estágios iniciais da divergência (de Queiroz, 2007).

Uma consequência da adoção do conceito unificado de espécie é que todas as linhagens no nível populacional evoluindo separadamente são espécies. Assim, não apenas linhagens isoladas reprodutivamente, diferenciadas ecologicamente, diagnosticáveis ou apenas distinguíveis fenotipicamente são espécies. Mesmo linhagens indiferenciadas e não diagnosticáveis são espécies (de Queiroz, 2005a).

Linhagens podem ser separadas por muitos fatores diferentes, incluindo barreiras extrínsecas (ex.: geográficas). Uma consequência disso é que existe muito mais espécies na Terra do que os biólogos estão preparados para aceitar sob o ponto de vista tradicional. Muitos dos táxons que tem sido reconhecidos sob os conceitos tradicionais de espécie são provavelmente compostos de múltiplas espécies (de Queiroz, 2005a).

3 Delimitação Taxonômica

As espécies são unidades fundamentais nos estudos sistemáticos, ecológicos, evolutivos, e a delimitação de espécies está cada vez mais importante devido ao fato de que a biota mundial está cada vez mais reduzida e ameaçada (Wiens & Servedio, 2000; Hausdorf & Henning, 2010). A delimitação taxonômica representa o primeiro passo nos estudos de

enquadramento de conservação, ecologia, evolução, filogenética e genética de populações (de Queiroz, 2005c; Barret *et al.*, 2011). Por razões práticas e históricas, a maioria das espécies têm sido primariamente descritas com base na morfologia. Como principal vantagem, os caracteres taxonômicos frequentemente servem para alocar indivíduos a espécies imediatamente por inspeção visual, e são aplicáveis tanto a espécimes vivos quanto a espécimes preservados e fósseis (Wiens, 2007; Duminil & Di Michele, 2009; Padial *et al.*, 2010; Duminil *et al.*, 2012). No entanto, indivíduos diferentes da mesma espécie podem apresentar uma variação em sua morfologia, quer naturalmente ou em conexão com adaptações locais. Essa variação morfológica intraespecífica pode ser a origem de uma delimitação inflada de espécie. Teoricamente existe uma estreita relação entre um genótipo e um fenótipo. Uma notável exceção é relacionada a plasticidade fenotípica em plantas no qual a expressão do genoma difere em função das condições ambientais levando a diferentes morfologias (Duminil & Di Michele, 2009).

A identificação de espécies pode ser problemática devido à falta de caracteres morfológicos diagnósticos claros e visíveis, especialmente nos trópicos. As causas das dificuldades na delimitação taxonômica em alguns grupos de táxons dos trópicos são pouco compreendidas, e alguns processos evolutivos podem explicar esse problema, incluindo divergência filogenética recente, introgressão, alta plasticidade morfológica, diferenciação genética em andamento e barreiras parciais ao fluxo gênico entre ecótipos (Duminil *et al.*, 2012). A corroboração dos limites de espécies via linhas independentes de evidência é muito importante para o diagnóstico de espécie (de Queiroz, 1998, 1999, 2005a, 2005b, 2005c, 2007; Knowles & Carstens, 2007; Barret *et al.*, 2011). Nas últimas décadas o uso de marcadores moleculares como ferramenta para delimitação de espécies tem aumentado drasticamente. Em plantas, os genomas plastidial e nuclear são os mais utilizados (Duminil & Di Michele, 2009). Pode-se integrar dados de múltiplos *loci* para determinar os limites de espécies, sem ter esses limites definidos *a priori*. Portanto, tal metodologia permite estimar a base estatística para as decisões em nível de espécie (Wiens, 2007; Petit & Excoffier, 2009).

Quanto maior o fluxo gênico intraespecífico, menor fluxo gênico interespecífico é esperado. Isso apoia a ideia de que marcadores com altas taxas de fluxo gênico intraespecífico parecem mais adequados para o uso em delimitação taxonômica (Petit & Excoffier, 2009). Marcadores organelares herdados matematicamente (DNA plastidial - cpDNA) que são apenas

dispersos por sementes, devem ser mais frequentemente introgrididos e assim de valor taxonômico mais limitado do que marcadores nucleares (Petit & Excoffier, 2009). Ao delimitar as espécies com base em marcadores moleculares, uma validação dos limites de espécies é geralmente necessária a partir da informação fornecida pelos marcadores morfológicos (Duminil & Di Michele, 2009).

Marcadores genéticos neutros não são afetados por condições ambientais, e devem ser informativos sobre as barreiras de espécies, seja qual for a heterogeneidade de condições ambientais sobre a área de distribuição das mesmas (Duminil & Di Michele, 2009). Os microssatélites são marcadores moleculares altamente polimórficos e com altas taxas de mutação. Em princípio esses marcadores devem ser muito informativos para caracterização da diversidade genética, sobre as barreiras de espécies, mesmo em caso de recente especiação, além de fornecerem informação sobre a ocorrência potencial de hibridação entre espécies (Duminil *et al.*, 2006; Duminil & Di Michele, 2009). Juntamente com os métodos de atribuição (ex.: método Bayesiano de atribuição), eles classificam os indivíduos em grupos que podem corresponder as espécies parentais e são capazes de detectar genótipos intermediários que são provavelmente híbridos. Mas a principal desvantagem destes são as altas taxas de mutação, o que os torna marcadores homoplásicos. No entanto, o estudo de múltiplos *loci* de microssatélites pode controlar esse efeito (Duminil & Di Michele, 2009; Duminil *et al.*, 2012).

Alguma ambiguidade em hipóteses de limites de espécies que divergiram recentemente podem permanecer devido a separação incompleta de linhagens, retenção de polimorfismo ancestral, introgressão secundária, deficiências de amostragem ou desacordo sobre a importância de caracteres relevantes para delimitação (Minder & Widmer, 2008; Hausdorf & Henning, 2010; Ross *et al.*, 2010). Para minimizar essa problemática, vários estudos recentes utilizam uma abordagem integrada na delimitação de espécies, fazendo o uso de dados moleculares, morfológicos e ecológicos (Jørgensen *et al.*, 2008; Shaffer & Thomson, 2007; Leaché *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2010; Weisrock *et al.*, 2010; Barret *et al.*, 2011; Pettengill & Neel, 2011; Pessoa *et al.*, 2012), a fim de obter melhores evidências da distinção das mesmas.

4 Hibridação

Os padrões de fluxo gênico ao longo do processo de especiação de uma espécie dependem especificamente do modo de especiação, podendo variar de totalmente ausente, como no caso da especiação alopátrica, que ocorre quando populações divergentes são fisicamente isoladas e não trocam genes entre si; ou presente, no caso de especiação simpátrica, na qual a especiação prossegue sem um isolamento espacial e com a divergência ocorrendo sob condições de cruzamentos aleatórios; e com padrões intermediários na especiação parapátrica, visto que moderados níveis de fluxo gênico persistem durante o processo de divergência devido a parciais mas incompletas barreiras ao cruzamento (Coyne & Orr, 2004; Abbott *et al.*, 2008).

Hibridação refere-se ao cruzamento entre espécies, populações geneticamente diferentes ou raças dentro de uma espécie (Soltis & Soltis, 2009). A hibridação pode ocorrer em contextos espaciais muitos diferentes, assim como também pode diferir em contexto temporal, por exemplo, contato secundário depois de um período de evolução independente *vs* contato contínuo com seleção divergente (Abbott *et al.*, 2013). Uma significativa porção dos eventos de especiação em plantas envolve hibridação, em contraste com a maioria de outros clados, nos quais a especiação é divergente (Soltis & Soltis, 2009).

Wu (2001), propôs a visão gênica de especiação, na qual espécies são definidas como grupos que são diferencialmente adaptados, e em contato, não são capazes de compartilhar genes que controlam estes caracteres adaptativos através de trocas diretas ou através de populações híbridas intermediárias. A visão gênica de especiação propõe que o isolamento reprodutivo é uma consequência de diferenças na adaptação, controlada por um moderado número de genes individuais em vez de todo o genoma. Embora alelos desses genes não podem mover-se entre espécies, é possível ocorrer fluxo gênico interespecífico em outros *loci* que são neutros para o efeito da seleção natural (Wu, 2001).

Alguma porção do *pool* gênico de cada táxon envolvido na hibridação deve permanecer constante e incontaminada, de tal forma que podemos reconhecer que dois *pools* gênicos existem. Os genes que definem esses dois *pools* gênicos e os fazem distintos são aqueles que compreendem o limite de espécies. Alguns autores caracterizam os limites de espécies como semipermeáveis, com a permeabilidade variando em função da região do genoma. Um limite semipermeável entre espécies (Figura 4) implica que a introgressão

diferencial é o resultado de um processo seletivo, com alelos em alguns *loci* capazes de cruzar o limite, enquanto alelos de outros *loci* não podem (Harrison & Larson, 2014).

A divergência em face a algum fluxo gênico é possível, especialmente onde a seleção é forte. Isolamento reprodutivo de todo genoma não é necessário para manter diferenças significativas entre o que, por qualquer razoável definição, são entidades consideradas como espécies distintas. Isso significa que a hibridação é provavelmente comum entre espécies animais bem como entre muitas espécies de plantas, e alguns traços híbridos podem auxiliar o processo de especiação em ambos animais e plantas (Abbott *et al.*, 2008).

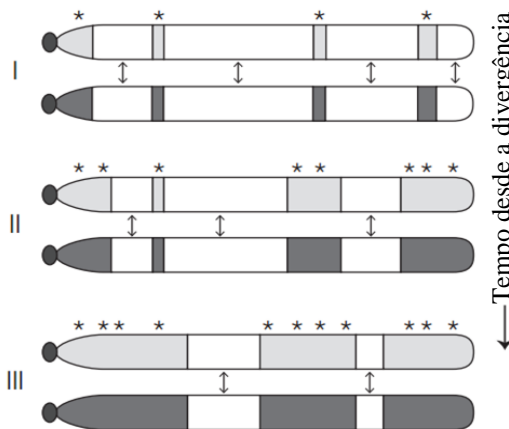


Figura 4. Natureza semipermeável do limite de espécies baseado em Wu (2001). Cada par de barras horizontais representam cromossomos de duas linhagens divergindo. Espécies que divergiram muito recentemente (par I) podem ter poucos genes contribuindo para o isolamento reprodutivo (indicado por *). Essas regiões podem permanecer diferenciadas (regiões pintadas), enquanto a troca de genes pode ocorrer em outras partes do genoma (regiões brancas). Com o aumento da divergência genética (pares de cromossomos II e III), tem um aumento do número de *loci* que contribuem para barreiras reprodutivas, restringindo assim o fluxo gênico para uma grande proporção do genoma. Modificado: Harrison & Larson, 2014.

Pouco é conhecido sobre a natureza dos limites de espécies entre espécies estreitamente relacionadas que hibridizam após contato secundário. Se os genomas de tais espécies agem como unidades coesivas, a hibridação pode ser esperada como um fenômeno

efêmero e local, com pouca ou nenhuma consequência evolutiva. Por outro lado, se as diferentes espécies têm uma base gênica, genomas podem ser esperados para serem permeáveis e abertos à introgressão gênica. Essa diferença pode ter importantes consequências evolutivas e ecológicas (Minder & Widmer, 2008).

Nesse contexto, uma questão ainda não resolvida é como algumas espécies que hibridizam podem manter seus fenótipos distintos fora das zonas híbridas, apesar da introgressão gênica, enquanto outras se fundem e formam táxons híbridos. Uma possível explicação é que em algumas espécies em hibridação com adaptações diferenciais, a seleção divergente age em genes particulares e assim previne a introgressão em torno de regiões genômicas. A seleção divergente poderia assim neutralizar a força do fluxo gênico e manter os limites de espécie na presença de introgressão gênica (Minder & Widmer, 2008).

Em alguns casos os padrões de introgressão parecem ser diferentes quando os dados estão disponíveis para múltiplos transectos ao longo de uma mesma zona híbrida. Isso sugere que o limite de espécie pode variar geograficamente, talvez como um resultado de adaptação local em ambientes heterogêneos. Regiões genômicas que consistentemente mostram introgressão reduzida entre pares de táxons em hibridação provavelmente abrigam genes que contribuem para barreiras que são independentes da variação ambiental (Harrison & Larson, 2014).

5 Problemática do estudo

Aechmea comata, *A. caudata* e *A. kertesziae* são espécies de pétalas amarelas pertencentes ao subgênero *Ortgiesia* que apresentam problemática de delimitação taxonômica e suspeita de hibridação na natureza. *Aechmea comata* é encontrada principalmente na ilha de Santa Catarina com poucos registros da espécie em outras regiões (*speciesLink*: <http://www.splink.org.br>). Já *A. kertesziae* apresenta uma distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo desde a região norte (Itajaí) até o sul (Laguna) do estado de Santa Catarina (Smith & Downs, 1979; Reitz, 1983). Ambas ocorrem na região litorânea e apresentam grande plasticidade morfológica, o que muitas vezes também dificulta a separação taxonômica, além de ocorrerem em simpatria na ilha de Santa Catarina, onde indivíduos com morfologia intermediária são observados (Reitz, 1983; Goetze, 2014). Também, apresentam sobreposição do período de floração, principalmente nos meses

de julho, agosto, setembro e novembro (Smith & Downs, 1979; Reitz, 1983; Lenzi *et al.*, 2006), além de compartilharem polinizadores (mamangavas; Lenzi *et al.*, 2006, M.V. Büttow, comunicação pessoal).

Aechmea caudata apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo ao longo da Mata Atlântica, desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul (Goetze, 2010). Ela é observada ocorrendo em simpatria com outras espécies de pétalas amarelas do subgênero *Ortgiesia* em algumas regiões ao longo da área de ocorrência. Na ilha de Santa Catarina, populações simpátricas de *A. caudata* e *A. comata* são encontradas (Goetze, 2014). *Aechmea caudata* floresce preferencialmente em janeiro (Reitz, 1983; Goetze, 2014), enquanto indivíduos de *A. comata* podem ser observados em floração ao longo de todo o ano (Lenzi *et al.*, 2006). As duas espécies apresentam sobreposição do período de floração nos meses de janeiro, junho e agosto (Smith & Downs, 1979; Reitz, 1983; Lenzi *et al.*, 2006; Kamke *et al.*, 2011). Assim como *A. comata* e *A. kertesziae* compartilham polinizadores, *A. caudata* e *A. comata* também compartilham um polinizador, a abelha *B. morio* (Lenzi *et al.*, 2006; Kamke, 2009).

Dados moleculares oriundos do sequenciamento de duas regiões intergênicas plastidiais (*rpl32-trnL* e *rps16-trnK*), indicaram um compartilhamento de haplótipo entre *A. comata* e *A. kertesziae*, na área de simpatria, não tendo sido possível identificar se esse padrão é devido à retenção de polimorfismo ancestral, hibridação, e/ ou ao fato de elas não serem *taxa* distintos (Goetze, 2014). Além disso, no mesmo estudo citado anteriormente, foi observado um indivíduo morfológicamente identificado como *A. comata* mas com perfil molecular do genoma plastidial de *A. caudata*, indicando um possível evento antigo de hibridação entre essas duas espécies, com captura de cloroplasto. Porém, a ocorrência de hibridação entre *A. caudata* e *A. comata* precisa ser confirmada, uma vez que somente um indivíduo possivelmente híbrido foi identificado no estudo citado.

6 Objetivo Geral

O objetivo geral da presente proposta é investigar os limites taxonômicos entre *A. comata*, *A. caudata* e *A. kertesziae* e a ocorrência de híbridos entre elas, utilizando dados morfológicos, moleculares e ecológicos em uma abordagem integrada.

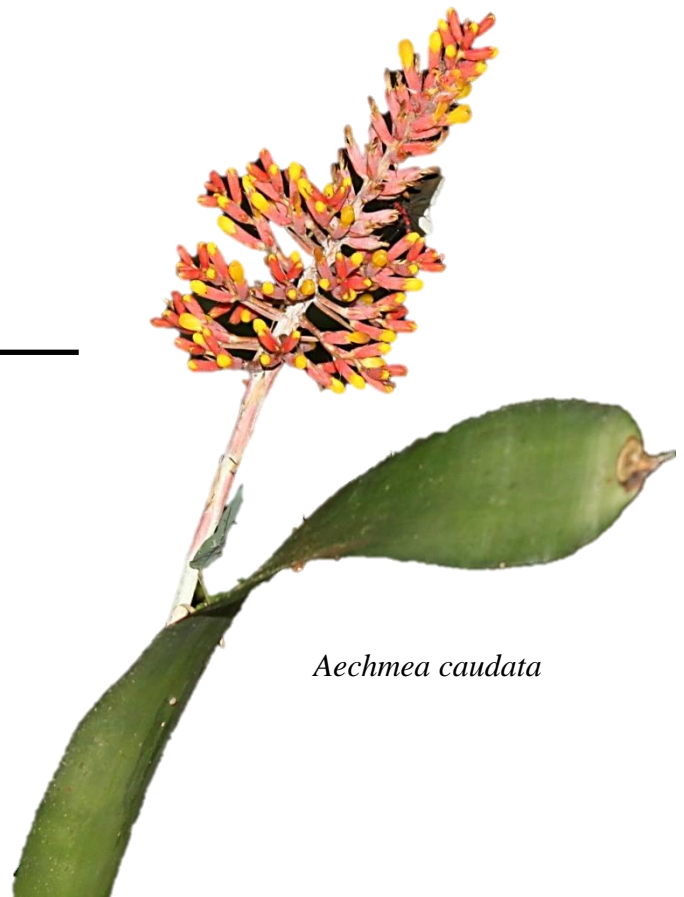
6.1 Objetivos Específicos

- I. Estimar a diversidade genética de *A. comata*, *A. caudata* e *A. kertesziae* a partir de microssatélites nucleares e plastidiais;
- II. Identificar *pools* gênicos específicos para cada uma das espécies através de análises Bayesianas com microssatélites nucleares ou então a ocorrência de hibridação entre *A. comata* – *A. caudata* e *A. comata* – *A. kertesziae*.
- III. Acessar a variabilidade morfológica de *A. comata*, *A. caudata* e *A. kertesziae* e avaliar a contribuição dos caracteres morfológicos utilizados na separação dessas espécies;
- IV. Identificar e caracterizar dados ecológicos de fina escala que auxiliem na separação das espécies;
- V. Avaliar o isolamento reprodutivo de *A. comata* – *A. caudata* e *A. comata* – *A. kertesziae* através de experimentos controlados de polinização.

Capítulo II

Hybridization in sympatric bromeliad species (*Aechmea* spp.): The maintenance of the species boundary in *A. comata*

Artigo a ser submetido à *Annals of Botany*



Aechmea caudata

1 **Hybridization in sympatric bromeliad species (*Aechmea* spp.): The maintenance of the**
2 **species boundary in *A. comata***

3 Laís Mara Santana Costa, Márcia Goetze, Sidia M. Callegari-Jacques and Fernanda Bered*
4
5 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de
6 Genética, Avenida Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS,
7 Brazil. *Author for correspondence: (fernanda.bered@ufrgs.br). Telephone: +55 51 3308-
8 6742

- 9 • *Background and Aims* *Aechmea comata*, *A. caudata* and *A. kertesziae* present
10 problems of taxonomic delimitation and we hypothesized that these species may
11 hybridize in nature. This study aimed to explore the extent of morphological,
12 ecological and molecular variation, levels of reproductive isolation and interspecific
13 gene flow among these species.
- 14 • *Methods* A total of 244 individuals were genotyped for ten nuclear microsatellites,
15 and 231 for six plastid microsatellites, collected from four allopatric and four
16 sympatric areas. Bayesian genetic assignments were used to detect hybrids between
17 *A. comata* and *A. caudata* and with *A. kertesziae*. Estimates of genetic diversity for
18 each species and population were also obtained. Principal component analysis was
19 performed based on floral morphology, and correspondence analysis to detect
20 microhabitat preferences. The reproductive compatibility of these species was tested
21 through artificial crosses.
- 22 • *Key Results* Hybridization between *A. comata* with *A. caudata* and *A. kertesziae* was
23 confirmed by molecular analyses, and the hybrids identified did not present
24 intermediate morphology between the parental species. *Aechmea comata*
25 demonstrated reproductive compatibility with *A. caudata* and *A. kertesziae*, and has
26 higher interspecific gene flow with *A. kertesziae* than with *A. caudata*. Floral
27 morphology clearly differentiated *A. comata* and *A. caudata*, although *A. kertesziae*
28 overlapped with both species. The three species exhibit different preferences of
29 microhabitat, and *A. comata* has demonstrated the highest genetic diversity already
30 reported for bromeliads, despite being a rare species restricted to the Santa Catarina
31 Island.
- 32 • *Conclusions* The patterns of genetic, morphological, and ecological variation are
33 coincident with species delimitation. Hybrids can not be identified solely based on
34 morphology, which demonstrate the care that must be taken when considering this
35 group of species. It is likely that a set of prezygotic barriers as phenological and
36 ethological isolation, self-compatibility, and perhaps postzygotic barriers, are
37 involved in maintaining species integrity of *A. comata*.

38 **Key words:** *Aechmea comata*, *A. caudata*, *A. kertesziae*, Bromeliaceae, Hybridization,
39 microsatellites, pre- and postzygotic barriers, rare species.

40 **INTRODUCTION**

41 Hybridization in plants is considered a creative force, not only an important source of new
42 variation, but it also plays a more diverse role in promoting speciation. It may provide the
43 raw material for adaptive divergence, or initiate new hybrid populations, potentially leading
44 to speciation (Harrison, 1993; Abbott *et al.*, 2013). For pairs or groups of species that are
45 products of recent divergence or that continue to exchange genes, species boundaries can be
46 difficult to define, not only because there is little differentiation, but also because there may
47 be discordance among character sets. Discordance can reflect differential levels of
48 introgression, but it is also expected because of retention of ancestral polymorphism, random
49 lineage sorting, and long periods required for many or most loci to achieve reciprocal
50 monophyly (Harrison and Larson, 2014).

51 Barriers to gene exchange might accumulate through time, when gene flow does not occur
52 due to spatial isolation or physical obstacles to dispersal. However, it is common for
53 populations that have not yet developed complete reproductive barriers to be in contact at
54 some stage of divergence, often due to range changes, allowing gene flow between them
55 (Abbott *et al.*, 2013). While reproductive isolation and barriers to gene exchange are
56 potentially incomplete, the species boundaries can be considered semipermeable. A
57 semipermeable boundary between species implies that differential levels of introgression are
58 the result of a selective process, where alleles at some loci are able to cross the boundary,
59 whereas alleles at other loci cannot (Rieseberg *et al.*, 2004; Harrison and Larson, 2014).

60 Compatibility between sexual taxa declines as a result of two distinct processes, during or
61 after speciation. First, mating behavior or gametic recognition may diverge and reduce the
62 rate of interpopulation fertilization, causing “prezygotic isolation”. Second, genetic changes
63 between taxa may cause hybrid sterility or inviability, or “postzygotic isolation” (Mayr,
64 1963; Dobzhansky, 1970). According to Rieseberg and Willis (2007), multiple reproductive
65 barriers isolate most plant species: prezygotic barriers (e.g. ecogeographical, mechanical,
66 temporal, pollinator isolation, advantage of conspecific pollen in fertilizing eggs compared
67 with non-conspecific pollen), and postzygotic barriers (e.g. hybrid inviability, sterility, and
68 the failure or reduction in successful reproduction in subsequent generations - hybrid
69 breakdown).

70 Interspecific hybridization is widely considered to be an important evolutionary mechanism
71 in plants and this is also true for the highly diverse family Bromeliaceae. Hybridization is
72 commonly put forward as explanation for the challenges of species description and
73 identification in this family (Palma-Silva *et al.*, 2016). Although reports on natural hybrids
74 in Bromeliaceae are not very frequent, it can be expected that hybridization has been an
75 important force in the diversification of the family, especially in the very rapidly diversifying
76 lineages as Puyoideae and Bromelioideae (Schulte *et al.*, 2010). Presumably, the extent of
77 natural hybridization in Bromeliaceae is currently underestimated due to the difficulties in
78 recognizing hybrids based on morphological characters (Schulte *et al.*, 2010).

79 *Aechmea* is the largest genus of the subfamily Bromelioideae, comprising 282 species (Reitz,
80 1983; Gouda *et al.*, cont. updated). It is composed of several species complexes with many
81 taxonomic challenges because of extensive morphological variability, homoplasy in
82 characters traditionally used in taxonomy, and uncertainties about the taxonomic value of
83 morphological characters (Faria *et al.*, 2004, 2010; Evans *et al.*, 2015). *Aechmea* is
84 subdivided into eight subgenera based mainly on floral characters (Smith and Downs, 1979).
85 *Aechmea* subgenus *Ortgiesia* comprises about 20 species, most of which are endemic to the
86 Atlantic rainforest (Smith and Downs, 1979). The crown diversification of *Ortgiesia* was
87 estimated to have started during the late Pliocene, at around 2.5 million years ago (mya)
88 (Silvestro *et al.*, 2014). Goetze *et al.* (2016), suggest a scenario of recent diversification for
89 the subgenus in southern Atlantic Forest. Morphologically, two main groups of species can
90 be identified in *Ortgiesia*: one possess flowers with yellow petals, and the other has flowers
91 with blue petals. The yellow-flowered group of species is geographically restricted to the
92 south of Brazil, with the exception of *A. caudata*, which also occurs further north (Smith and
93 Downs, 1979).

94 *Aechmea comata*, *A. caudata* and *A. kertesziae* are yellow petaled species that present
95 problems of taxonomic delimitation and are hypothesized to hybridize in the wild. *Aechmea*
96 *comata* is a rare species found mainly in the Santa Catarina Island with few records in other
97 regions (speciesLink: <http://www.splink.org.br>). *Aechmea kertesziae* presents a larger
98 geographical distribution, occurring from latitudes of 26° to 28° S, in Santa Catarina state
99 (Smith and Downs, 1979; Reitz, 1983). Both species occur in the coastal region and present

100 great morphological plasticity. They can be found in sympatry in the Santa Catarina Island,
101 where individuals with intermediate morphology are observed (Reitz, 1983; Goetze, 2014).
102 *Aechmea caudata* presents a wide geographical distribution, occurring along the Atlantic
103 Forest, from latitudes of 20° to 33° S (Goetze, 2010). It is observed to occur in sympatry with
104 other species with yellow petals of the subgenus *Ortgiesia* in some regions along the area of
105 occurrence. Sympatric populations of *A. caudata* and *A. comata* can be found in the Santa
106 Catarina Island (Goetze *et al.*, 2016).

107 A recent study involving species of *Aechmea* subgenus *Ortgiesia* of yellow petals detected a
108 putative hybrid between *A. comata* and *A. caudata*. In the same study, *A. comata* and *A.*
109 *kertesziae* showed plastid haplotype sharing in the area of sympatry, and it was not possible
110 to identify whether this pattern was due to the retention of ancestral polymorphism,
111 hybridization, and/or the fact that they are not distinct taxa, as the delimitation using
112 morphology is challenging (Goetze, 2014).

113 In this study, we analysed morphological, ecological and molecular (both nuclear and
114 chloroplast - cpDNA) data, from allopatric and sympatric populations of the three *Aechmea*
115 species to explore the extent of morphological, ecological and molecular variation, levels of
116 reproductive isolation and interspecific gene flow among them. Specifically, we aimed: (i)
117 to investigate if *A. comata* hybridize with *A. caudata* and *A. kertesziae* in the wild. (ii) If
118 hybridization occurs, to characterize the hybrid zones, assessing the magnitude of admixture
119 and the degree of intra- and interspecific genetic variation in allopatric and sympatric
120 populations. (iii) To identify potential barriers (pre- and/or postzygotic) for the maintenance
121 of species boundaries. (iv) To investigate how the genetic admixture relates to the degree of
122 morphological and ecological differentiation among species. (v) To examine the species
123 reproductive compatibility through manual crossing experiments. Additionally, in light of
124 our results we discuss some conservation remarks for the species.

125

126 MATERIAL AND METHODS

127 *Plant species and population sampling*

128 *Aechmea comata*, *A. caudata* and *A. kertesziae* can be terrestrials, rupicolous or epiphytic
129 species that occur in dense ombrophilous forest in the Brazilian Atlantic Forest, and in
130 ‘restinga’ vegetation in the Brazilian sandy coastal plains, in southeastern and southern Brazil
131 (Reitz, 1983). These three species have overlapping flowering phenologies, share one
132 pollinator (the bee *Bombus morio* Swederus (Apidae); Lenzi *et al.*, 2006; Kamke *et al.*, 2011;
133 M. Büttow, unpubl. res.), and are found in sympatry in Santa Catarina Island (Smith and
134 Downs, 1979; Reitz, 1983; Goetze *et al.*, 2016). Despite *A. comata* is described with
135 flowering peak between July and November (Reitz, 1983), this species presents distinct floral
136 phenology patterns, varying accordingly to the environment in which it is found, high
137 luminosity (restinga) or low luminosity (understory). The flowering in environments of low
138 luminosity is steady state, while in environments of high luminosity can be classified as
139 multiple bang, because it has multiple flowering periods throughout the year (Lenzi *et al.*,
140 2006; Dorneles *et al.*, 2011). *Aechmea caudata* shows flowering peak between December
141 and January and *A. kertesziae* between April, July and November (Reitz, 1983).

142 These species have similar floral morphology. *Aechmea comata* and *A. kertesziae* have
143 simple inflorescence (cylindric or ellipsoid), which can be multifloral with sessile flowers.
144 The flowers present tubular corolla, yellow petals and pink sepals. *Aechmea caudata* has a
145 compound inflorescence, generally pyramidal with sessile flowers. Tubular corolla, and
146 flowers with yellow petals and red sepals (Smith and Downs, 1979; Reitz, 1983; Fig. S1,
147 Supplemental Information). *Aechmea comata* and *A. kertesziae* present a great morphological
148 plasticity associated with shaded versus sunny environments, making the taxonomic
149 delimitation difficult (Reitz, 1983; Lenzi *et al.*, 2006). Allied to this, individuals with
150 intermediate morphology are observed between them in sympatric populations (Fig. S2,
151 Supplemental Information; Reitz, 1983; Lenzi *et al.*, 2006; Goetze, 2014). *Aechmea comata*
152 was described as self-compatible by Lenzi *et al.* (2006), and as self-incompatible by Dorneles
153 *et al.* (2011). *Aechmea caudata* and *A. kertesziae* are both self-incompatible species (Kamke
154 *et al.*, 2011; Capra, 2012).

155 All sampled populations were collected in Santa Catarina state (latitudes of 26° to 28° S). We
156 collected young leafs from 14 to 53 individuals per population, from four allopatric and four
157 sympatric areas (two sympatric areas for each pair of species, *A. comata* and *A. caudata*, and

158 *A. comata* and *A. kertesziae*; Fig. 1). We sampled a total of 244 individuals in eight areas.
159 Names, sample sizes, geographical coordinates and voucher information for each area are
160 given in Supplemental Information Table S1. The sampling was randomly conducted, with a
161 minimum of 5 m of distance between plants to avoid the collection of individuals resulting
162 from vegetative reproduction (individuals growing in clusters). Only individuals with flowers
163 or fruits were collected to avoid misidentification. Fresh leaves of each sample were stored
164 in silica gel for drying and total genomic DNA was extracted using the
165 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), protocol described by Doyle and Doyle (1990).

166 ***Nuclear and plastid microsatellite markers***

167 In this study we used ten nuclear microsatellite markers, four isolated from *Ananas comosus*
168 (Acom 12.12, Acom 78.4, Acom 82.8, and Acom 91.2; Wohrmann and Weising, 2011), two
169 from *Orthophytum ophiuroides* (Op77 and Op92; Aoki-Gonçalves *et al.*, 2014), two from *A.*
170 *caudata* (Ac01 and Ac25; Goetze *et al.*, 2013), one from *A. organensis* (Ao6; Abondanza,
171 2012) and one from *Fosterella rusbyi* (NgFos22; Wohrmann *et al.*, 2012). We choose these
172 polymorphic markers based on cross-amplification tests performed in this study. A total of
173 244 individuals were genotyped. Six plastid microsatellite loci from *Dyckia marnier-*
174 *lapostollei* var. *estevessii* (N05, N10, N16, N18, L01, L04; Krapp *et al.*, 2012) were used for
175 identifying and characterizing plastid DNA haplotypes from 231 individuals.

176 Nuclear microsatellite loci were amplified by using polymerase chain reaction (PCR)
177 performed in a Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems) according to Zanella *et al.*
178 (2012a), and a standard touchdown-cycling program following Palma-Silva *et al.* (2007). For
179 plastid microsatellite loci, all PCR amplifications were performed in 10 µl reactions
180 containing 10 ng DNA template, 1 x *Taq* DNA polymerase buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM
181 dNTPs, 0.04 µmol forward primer, 1.6 µmol of each reverse primer and universal M13
182 primer, and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Promega), following cycling program described by
183 Krapp *et al.* (2012). The nuclear and plastid alleles were resolved on an ABI 3500 DNA
184 analyser sequencer (Applied Biosystems) and sized against the GS500 LIZ molecular size
185 standard (Applied Biosystems) using Genemarker demo version 1.97 (SoftGenetics, USA).

186 **Data analysis**

187 ***Nuclear admixture analysis for hybrids identification***

188 The classification of putative hybrids based on morphological characters in sympatric
189 populations was difficult because of the extensive morphological variability found in the
190 three species (Fig. S2, Supplemental Information). Thus, to identify hybrid individuals and
191 estimate the level of hybridization in sympatric areas, we performed admixture analysis with
192 a Bayesian clustering approach implemented in the software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*,
193 2000), using nuclear molecular markers. Allopatric populations of each species were used as
194 reference samples of pure individuals of *A. comata*, *A. caudata* and *A. kertesziae*. Analyses
195 were performed separately for each pair of species and sympatric zone, in each case including
196 the specimens from the allopatric populations as reference samples for each species. Structure
197 analysis for *A. comata* and *A. caudata* were carried out under the admixture model, assuming
198 correlated allele frequencies, using a burn-in period of 100 000 and run length of 500 000,
199 10 replicates per K , ranging from one to seven with all populations in the data set (sympatric
200 areas and allopatric populations). For *A. comata* and *A. kertesziae* we used a burn-in period
201 of 250 000 and run length of 1 000 000 with the same specifications mentioned above. We
202 determined the most probable number of genetic groups (K), using Structure Harvester (Earl
203 and von Holdt, 2012) according to the method described by Evanno *et al.* (2005). We then
204 performed analyses for each sympatric zone using the $K = 2$ model and ten replicates per K ,
205 because we assumed that the two species contributed to the gene pool of the samples, for
206 each pair of species.

207 Structure was used to classify individuals among the two parental species and hybrids in each
208 pair of species, using a threshold of $q \leq 0.10$ to classify pure individuals of *A. comata*, $q \geq$
209 0.90 to classify pure individuals of *A. caudata* or *A. kertesziae*, and $0.10 \leq q \leq 0.90$ to classify
210 hybrids. These values of threshold for Structure were choose based in simulations performed
211 by Vähä and Primmer (2006) and Burgarella *et al.* (2009). All subsequent analyses with
212 hybrids were performed with individuals identified by Structure.

213 ***Nuclear and plastid genetic diversity***

214 The nuclear microsatellite loci were characterized in *A. comata*, *A. caudata*, *A. kertesziae*,
215 and their hybrids based on the number of alleles (A), number of private alleles (A_p), allelic
216 richness (R_s), observed (H_o) and expected (H_E) heterozygosities, and inbreeding coefficient

217 (F_{IS} ; Weir and Cockerham, 1984). These parameters were estimated for each population and
218 locus using the programs FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995) and MSA (Dieringer and Schlötterer,
219 2003). The software GENEPOP on the Web (Raymond and Rousset, 1995) was used to test
220 departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for each population and locus, within
221 each species and hybrids. We assessed nuclear genetic differentiation among the pair of
222 species using estimates of F_{ST} (Weir and Cockerham, 1984) and G'_{ST} (Hedrick, 2005)
223 calculated in FSTAT, considering only pure individuals of *A. comata*, *A. caudata* and *A.*
224 *kertesziae*. Partitioning of genetic diversity within and among pure individuals of *A. comata*,
225 *A. caudata* and *A. kertesziae* was examined by analysis of molecular variance (AMOVA)
226 implemented in Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). The significance of the model was
227 tested using 10 000 permutations. Pairwise effective migration rates (N_{em}) were estimated
228 among *A. comata*, *A. caudata* and hybrids and among *A. comata*, *A. kertesziae* and hybrids
229 in the sympatric areas, following a coalescent theory and maximum-likelihood based
230 approach using the software Migrate 3.0.3 (Beerli and Felsenstein, 1999). The computations
231 were carried out under the stepwise mutation model (Kimura and Ohta, 1978).

232 Plastid microsatellite loci were used to identify and characterize plastid DNA haplotypes.
233 Diversity was evaluated for all populations, using number of haplotypes observed in each
234 population (NH) and haplotype diversity (HD) using the software Haplotype Analysis 1.05
235 (Eliades and Eliades, 2009). A haplotype network was built based on plastid DNA haplotypes
236 for each pair of species using the software Network 4.6.1.5, applying median-joining option
237 (Bandelt *et al.*, 1999). The haplotype networks were post-processed with a maximum
238 parsimony algorithm (Polzin and Daneshmand, 2003) implemented in Network to remove
239 unnecessary links and median vectors. As for nuclear DNA, AMOVA in Arlequin was used
240 to assess patterns of plastid DNA differentiation in hierarchical models, using 10 000
241 permutations to test the significance of each model.

242 ***Compatibility and Fertility Estimates***

243 Genome compatibility and fertility of *A. comata* with *A. caudata* and with *A. kertesziae* were
244 estimated by testing seed viability of interspecific artificial crosses. Manual crossing
245 experiments were performed at the green house of the Botanical Department (UFRGS, Rio
246 Grande do Sul, Brazil). Artificial crosses were conducted as described in Cafasso *et al.*

247 (2005). The treatments used were: (i) intraspecific cross-pollination – control, and (ii)
248 interspecific cross-pollination of *A. comata* with *A. caudata* and with *A. kertesziae*. In total
249 57 flowers from 12 plants were used. The procedures of seed asepsis and germination tests
250 were conducted according to Rios *et al.* (2016) with few modifications. A maximum of 32
251 seeds per fruit was analyzed in the germination tests. Seed germination was monitored daily,
252 and after 21 days, the number of seedlings was counted to evaluate hybrids viability.
253 Viability of seeds between intraspecific and interspecific crosses were compared using the
254 Mann-Whitney test with the WinPepi 11.65 software (Abramson, 2004).

255 Since parthenocarpy in the genus *Aechmea* is a common event (Lenzi *et al.*, 2006; Büttow,
256 2012), seedless fruits were excluded from the following analysis. Fruits that formed seeds
257 and seed viability were evaluated to estimate the degree of two postmating isolation indices,
258 based on interspecific crosses: one prezygotic (pollen-stigma incompatibility affecting fruit
259 formation – $RI_{\text{prezygotic}}$), and one postzygotic (embryo mortality affecting seed viability –
260 $RI_{\text{postzygotic}}$), according to Scopece *et al.* (2007). Because all crosses were bidirectional (each
261 species was used both as pollen receiver and donor), reciprocal indices were averaged to
262 provide a mean isolation index for each treatment.

263 The pollen-stigma incompatibility isolation index was calculated as $RI_{\text{prezygotic}} = 1 - (\text{mean \%}$
264 $\text{number of fruits in bidirectional interspecific crosses} / \text{mean \% number of fruits in}$
265 $\text{bidirectional intraspecific crosses})$. The embryo mortality isolation index was calculated as
266 $RI_{\text{postzygotic}} = 1 - (\text{mean \% seed viability in bidirectional interspecific crosses} / \text{mean \% seed}$
267 $\text{viability in bidirectional intraspecific crosses})$. All values of isolation may vary between 0
268 (no isolation) and 1 (complete isolation).

269 ***Morphological and ecological analyses***

270 In the field, we examined the floral morphology of 236 individuals, measuring four
271 characters: the total number of flowers, the height of the rachis (cm), the width of floral bract
272 (mm) of a flower at the base of the inflorescence, and the lower width of the rachis (cm) (Fig.
273 S3, Supplemental Information). A standard ruler and digital caliper were used. These traits
274 were described to be different among the three species (Smith and Downs, 1979; Reitz,
275 1983). For multivariate analyses, the variables total number of flowers, and the lower width

276 of rachis were transformed using Napierian logarithm (LN). We used a principal component
277 analysis (PCA) to determine whether the three species and hybrids could be distinguished by
278 these four morphometric variables. Additionally, the Kruskal-Wallis test was used to compare
279 the four variables among the parental species and hybrids. Discriminant analysis of principal
280 components (DAPC) was used to verify the proportion of individuals correctly or incorrectly
281 classified to each species in the field, according to morphological classification. Hybrids
282 were also included in the analysis because they do not present intermediate morphology
283 between the parental species (see results and discussion).

284 Additionally, aiming identify microhabitat preferences for each species and hybrids, we
285 recorded two microhabitat features: habitat (terrestrial, rupicolous or epiphytic), and
286 environment of occurrence (high or low solar luminosity) for 239 individuals. We performed
287 correspondence analysis (CA) for microhabitat data. Details of populations used in
288 morphological and ecological analyses are given in Supplemental Information Table S2. All
289 analyses (morphological and ecological) were conducted using the program SPSS 18.0
290 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

291 **RESULTS**

292 *Genetic composition of sympatric areas*

293 Genomic admixture analysis performed with a Bayesian clustering approach identified $K =$
294 2 as the most likely number of genetic clusters for both pairs of species (Fig. S4,
295 Supplemental Information), clearly discriminating *A. comata*, *A. caudata*, and *A. kertesziae*
296 genetic clusters. Results for each sympatric area of *A. comata* and *A. caudata*, considering
297 two genetic clusters, indicated that most of the samples were purebreds, and only three
298 individuals showed genetic mixtures between both clusters, in both sympatric areas: one
299 individual from PMLL sympatric area and two individuals from Moçambique (Fig. 2). In
300 contrast, results from sympatric areas of *A. comata* and *A. kertesziae* indicated that
301 hybridization is more common in this pair of species, with a total of 17 samples with
302 intermediate q -values ($0.10 \leq q \leq 0.90$), in both sympatric areas: three individuals from MLC
303 and 14 individuals from UCAD (Fig. 3). Therefore, hybridization between *A. comata* and
304 *A. caudata* occurred in a rate of 2.04% in PMLL and of 6.06% in Moçambique. For *A. comata*

305 and *A. kertesziae* the percentage of hybridization varied from 21.4% in MLC to 22.22% in
306 UCAD, considering the total sympatric individuals sampled in each population (Structure
307 threshold of $0.10 \leq q \leq 0.90$). Considering both sympatric areas of each pair of species, the
308 hybridization rate between *A. comata* and *A. caudata* was 3.66% and for *A. comata* and *A.*
309 *kertesziae* 25%.

310 ***Nuclear genetic diversity and differentiation***

311 All ten nuclear microsatellite loci were polymorphic for the two pairs of species. For *A.*
312 *comata*, *A. caudata* and hybrids the number of alleles per locus ranged from two to 16.
313 *Aechmea comata* showed 95 alleles (5-16 per locus), *A. caudata* 42 alleles (2-8 per locus),
314 and the hybrids 28 alleles (2-4 per locus). The mean allelic richness was 3.39 for *A. comata*,
315 2.49 for *A. caudata*, and 2.80 for hybrids (Table 1). The total observed and expected
316 heterozygosities were 0.644 and 0.722 for *A. comata*, 0.316 and 0.519 for *A. caudata*, and
317 0.600 and 0.613 for hybrids, respectively. The inbreeding coefficient (F_{IS}) was low, and did
318 not depart significantly from HWE for most of the loci for *A. comata* and hybrids. For *A.*
319 *caudata* F_{IS} values were high and departed significantly from HWE at almost all loci ($P <$
320 0.001; Table 1). Hybrids, on average, exhibited higher genetic diversity indices when
321 compared to *A. caudata* (Table 1).

322 For *A. comata*, *A. kertesziae*, and hybrids the number of alleles ranged from two to 14 per
323 locus. *Aechmea comata* showed 86 alleles (4-14 per locus), *A. kertesziae* 71 alleles (2-14 per
324 locus), and the hybrids 62 alleles (3-11 per locus). The mean allelic richness was 6.23 for *A.*
325 *comata*, 5.83 for *A. kertesziae*, and 6.04 for hybrids (Table 2). The total observed and
326 expected heterozygosities were 0.674 and 0.717 for *A. comata*, 0.561 and 0.630 for *A.*
327 *kertesziae*, and 0.642 and 0.699 for hybrids, respectively. The inbreeding coefficient (F_{IS})
328 was low, and did not depart significantly from HWE at almost all loci ($P < 0.001$; Table 2).
329 Hybrids, on average, demonstrated similar genetic diversity indexes to that of purebred
330 species (Table 2).

331 In both pairs of species analyzed, the genetic diversity levels were higher in *A. comata* than
332 in *A. caudata* and *A. kertesziae*, across all sympatric and allopatric populations (Tables 3 and
333 4). *Aechmea comata* and *A. caudata* from the sympatric area PMLL, *A. caudata* from

334 Caminho do Rei, *A. kertesziae* from Laguna, and from the sympatric area UCAD displayed
335 significant departures from HWE because of heterozygote deficits. The sympatric areas of *A.*
336 *comata* and *A. kertesziae* exhibit higher genetic diversity indices when compared to the
337 sympatric areas of *A. comata* and *A. caudata* (Tables 3 and 4).

338 *Aechmea comata* and *A. caudata* showed moderate levels of nuclear genetic differentiation,
339 $F_{ST} = 0.199$ and $G'_{ST} = 0.207$. The AMOVA results from the nuclear data set showed that
340 15.83% of genetic variation was among species, with $F_{CT} = 0.158$ ($P < 0.001$; Table 5). On
341 the other hand, *A. comata* and *A. kertesziae* showed low levels of nuclear genetic
342 differentiation, with $F_{ST} = 0.089$ and $G'_{ST} = 0.090$. The AMOVA results from the nuclear
343 data set showed that only 5.15% of the genetic variation was among species, with $F_{CT} = 0.052$
344 ($P < 0.01$; Table 6).

345 Maximum-likelihood based estimates of migration rates (N_{em} 'gene flow') for sympatric
346 areas of *A. comata* and *A. caudata* (PMLL and Moçambique), and for *A. comata* and *A.*
347 *kertesziae* (MLC and UCAD), were extremely low and similar, indicating restricted gene
348 flow between these pairs of species ($N_{em} < 1$). However, estimates of migration rates were
349 higher in *A. comata* and *A. kertesziae* than *A. comata* and *A. caudata*. PMLL and
350 Moçambique sympatric areas demonstrated equal interspecific migration between *A. comata*
351 and *A. caudata*, while MLC and UCAD demonstrated asymmetric migration towards *A.*
352 *comata* from *A. kertesziae*. In both pairs of species, N_{em} values were asymmetric towards
353 hybrids, with higher effective migrants from *A. comata* to hybrids (Figs. 4 and 5).

354 ***Plastid genetic diversity and haplotype network***

355 We identified fifty-two haplotypes for *A. comata* and *A. caudata* based on six plastid
356 microsatellite markers. Two major groups could be recognized in the haplotype network (Fig.
357 6), one of which contained ten haplotypes typical of *A. caudata* (individuals with $q \geq 0.90$ in
358 Structure analysis), whereas the other one was composed of forty-one haplotypes typical of
359 *A. comata* (individuals with $q \leq 0.10$). Haplotype sharing between species was not observed.
360 Haplotype diversity in populations ranged from 0.000 (one haplotype) to 1.000 (four
361 haplotypes). In general, populations of *A. comata* exhibited higher haplotype diversity (Table
362 3). Hybridization between *A. comata* and *A. caudata* was unidirectional (*A. comata* acting as

363 female parent and *A. caudata* acting as male parent) because the haplotypes observed in
364 hybrids are typical of *A. comata* (Fig. 6).

365 *Aechmea comata* and *A. kertesziae* showed sixty-two haplotypes, of which one was shared
366 among *A. comata*, *A. kertesziae* and hybrids (H9b), four were shared between *A. comata* and
367 *A. kertesziae* (H17b, H19b, H29b, and H37b), four between *A. comata* and hybrids (H33b,
368 H44b, H57b, and H62b), and three between *A. kertesziae* and hybrids (H53b, H54b, and
369 H61b; Fig. 7). Haplotype diversity in populations ranged from 0.476 (two haplotypes) to
370 1.000 (three haplotypes). Populations of *A. comata* showed higher haplotype diversity when
371 compared with populations of *A. kertesziae* (Table 4). Hybridization between *A. comata* and
372 *A. kertesziae* occurred in both directions (with both species acting as male and female
373 parental) because typical haplotypes of *A. comata* and *A. kertesziae* could be observed in
374 hybrids individuals (Fig. 7).

375 AMOVA results from the plastid data set showed that 28.6% of the genetic variation for *A.*
376 *comata* and *A. caudata* was found among species with $F_{CT} = 0.286$ ($P < 0.01$; Table 5). In
377 contrast, the genetic differentiation between *A. comata* and *A. kertesziae* in the plastid DNA
378 is lower than nuclear data set, with only 2.81% of variation among species ($F_{CT} = 0.025$, not
379 significant; Table 6).

380 ***Compatibility and Fertility Estimates***

381 All intraspecific and interspecific artificial crosses showed high percentage of viable seeds,
382 except for the interspecific cross between *A. comata* (female parental) and *A. caudata* (male
383 parental) in which only 52.59% of seeds were viable (Table 7). According to these results,
384 interspecific crosses of *A. comata* with *A. caudata* and with *A. kertesziae* could occur in both
385 directions.

386 Seed viability of intraspecific crosses for *A. comata* and *A. caudata* ranged from 73.33 to
387 100%, with a mean of 84.62% for *A. comata* and of 88% for *A. caudata*. The seed viability
388 of the interspecific crosses between these two taxa ranged from 0 to 100%. For the
389 intraspecific crosses of *A. comata* and *A. kertesziae* the seed viability ranged from 73.33 to
390 100%, with a mean of 84.62% for *A. comata* and of 92.31% for *A. kertesziae*. The seed
391 viability of the interspecific crosses between *A. comata* and *A. kertesziae* ranged from 90 to

392 100%. Comparisons between seed viability of intraspecific and interspecific crosses for *A.*
393 *comata* and *A. caudata* ($U = 74$, $P = 0.770$), and for *A. comata* and *A. kertesziae* ($U = 49$, P
394 $= 0.02$) showed that there is no statistical difference between intra- and interspecific crosses
395 for these pairs of species at the $P < 0.01$ level.

396 We calculated reproductive isolation indexes from 38 interspecific crosses (Table 7). The RI
397 for both *A. comata* x *A. caudata*, and for *A. comata* x *A. kertesziae* was incomplete. The
398 results showed that RI between *A. comata* and *A. kertesziae* is almost totally incomplete, with
399 $RI_{\text{prezygotic}}$ (fruit formation, 0.07) and $RI_{\text{postzygotic}}$ (seed viability, 0.00), compatible with the
400 high percentage of viable seeds in the interspecific crosses between these species (Table 7).

401 ***Morphological and ecological variation in parental species and hybrids***

402 The first two axes of PCA explained 82.74% of the total variance among groups (Fig. 8). The
403 first axis most effectively separated the three species, despite the large overlap of *A.*
404 *kertesziae* with *A. comata* and the small overlap with *A. caudata*. Hybrids could not be
405 distinguished from their respective parental species, because they were morphologically
406 similar to one of them (adjusted $P > 0.165$, Kruskal-Wallis test, data not shown; Fig. 8). The
407 variation observed in the morphological characters for the species and hybrids used for the
408 analyses are presented in Supplemental Information Table S3. The variables that most
409 positively contributed to the first axis were the total number of flowers, the height of the
410 rachis, and the lower width of the rachis. Width of floral bract negatively affected the first
411 axis (Table S4, Supplemental Information). Separation among species and hybrids was not
412 clear, and only a gradient of variation was observed associated with the second principal
413 component (y-axis) (Fig. 8). On the second axis the variables that most contributed were
414 width of floral bract and height of the rachis (Table S4, Supplemental Information).

415 Statistically significant differences among *A. comata* compared with *A. caudata* and *A.*
416 *kertesziae* was observed for all four morphological characters measured in this study
417 (adjusted $P < 0.01$, Kruskal-Wallis test, data not shown). Considering the field classification
418 of species based on morphological characteristics, 88.6% of the individuals would be
419 classified within the expected species, with the remaining individuals being classified within
420 another. Most of the incorrect classifications were for *A. kertesziae*, where 26.7% of

421 individuals were attributed to *A. comata* and 8.3% to *A. caudata* (Table S5, Supplemental
422 Information). The variation observed in the morphological characters for each of the
423 populations and hybrids used for the analyses are presented in Supplemental Information
424 Table S6.

425 The correspondence analysis revealed that the three species exhibit different preferences of
426 microhabitat, based on habitat and environment. *Aechmea comata* was associated with
427 terrestrial and rupicolous habitats in environments of high or low solar luminosity. *Aechmea*
428 *caudata* with rupicolous and epiphytic habitats in environments of low solar luminosity, and
429 *A. kertesziae* with terrestrial habitat in environments of high solar luminosity. Hybrids
430 between *A. comata* and *A. caudata* showed preference for terrestrial habitat and environments
431 of high or low solar luminosity, while hybrids between *A. comata* and *A. kertesziae* were
432 more associated with rupicolous and epiphytic habitat in environments of low solar
433 luminosity (Fig. 9).

434 **DISCUSSION**

435 *Hybridization of A. comata with A. caudata and A. kertesziae*

436 In this study, we aimed to investigate the occurrence of hybridization of *A. comata* with two
437 related species: *A. caudata* and *A. kertesziae*. We combined molecular markers,
438 morphological and ecological characters, and reproductive compatibility among these
439 species to provide a perspective on the nature of species boundaries. Our molecular data from
440 microsatellite markers suggest the occurrence of hybridization among these species in the
441 four sympatric areas analyzed (Figs. 2, 3, 6, and 7), confirming the previous hypothesis
442 postulated by Goetze (2014). Different hybridization patterns were observed between these
443 two pair of species. *Aechmea comata* has higher gene flow with *A. kertesziae* than *A. caudata*,
444 and in all sympatric areas this species showed higher migration rates towards hybrids, when
445 compared to the others two species (Figs. 4 and 5).

446 We observed 17 hybrids between *A. comata* and *A. kertesziae* and only three between *A.*
447 *comata* and *A. caudata* (Figs. 2 and 3). This difference and the asymmetric gene flow towards
448 hybrids (Figs. 4 and 5) could be explained in part by the overlap of flowering time among
449 these species. Both *A. comata* and *A. kertesziae* have the flowering peak in the same period,

450 while the overlapping of the flowering time between *A. comata* and *A. caudata* only occurs
451 because *A. comata* presents multiple short flowering periods throughout the year (Lenzi *et*
452 *al.*, 2006; Dorneles *et al.*, 2011). The multiple bang flowering pattern of *A. comata* also would
453 allow a greater overlap of flowering with the hybrids, explaining the higher gene flow
454 towards these individuals.

455 Experimental crosses performed between these pairs of species confirm the genome
456 compatibility of *A. comata* with *A. caudata* and *A. kertesziae*. According to these results,
457 interspecific gene flow could occur in both directions for the two pairs of species (Table 7).
458 In contrast to the molecular nuclear results, haplotype sharing for maternally inherited plastid
459 DNA between *A. comata* and *A. caudata* was not observed, while the opposite occurred for
460 *A. comata* and *A. kertesziae*. Hybrids between *A. comata* and *A. caudata* showed haplotypes
461 typically of *A. comata*, whereas hybrids between *A. comata* and *A. kertesziae* showed
462 haplotypes typically found in both species (Figs. 6 and 7).

463 Incomplete reproductive isolation pre- (pollen-stigma incompatibility affecting fruit
464 formation) and postzygotic (embryo mortality affecting seed viability) were observed among
465 these species, but the lower RI was observed between *A. comata* and *A. kertesziae* (Table 7).
466 Reproductive isolation between species may be incomplete, particularly in groups that have
467 recently undergone multiple speciation events or those that have long generation times, in
468 agreement with the recent diversification in the subgenus *Ortgiesia* and long generation times
469 in the species studied (Rieseberg and Willis, 2007; Silvestro *et al.*, 2014; Goetze *et al.*, 2016).

470 Prezygotic isolation for both pairs of species was stronger than postzygotic isolation in this
471 study. Scopece *et al.* (2007) suggest that in some food-deceptive orchids the prezygotic
472 isolation can evolve faster than postzygotic isolation, as is typically observed in animals.
473 These insights have led to the perception that in animals prezygotic barriers are controlled
474 by few major genes and are important during early stages of speciation, whereas postzygotic
475 barriers are controlled by numerous genes of minor effect, which accumulate more gradually
476 (Coyne and Orr, 2004).

477 Studies indicate that the strength of postzygotic barriers increases with increasing genetic
478 distance among taxa, which suggests slow evolution of postzygotic barriers (Scopece *et al.*,

479 2007, 2008). Higher postzygotic isolation was observed among *A. comata* and *A. caudata*
480 (0.14) when compared to *A. comata* and *A. kertesziae* (0.00) (Table 7). This is in line with
481 the closer phylogenetic relationship between *A. comata* and *A. kertesziae* when compared
482 with *A. caudata* (Goetze *et al.*, 2016). Therefore, the lower seed viability in the interspecific
483 cross of *A. comata* (female parental) and *A. caudata* (male parental) and the low amount of
484 hybrids between these species (Fig. 2) could also be explained by postzygotic isolation
485 mechanisms together with the prezygotic mechanism mentioned above (flowering pattern).
486 Intrinsic postzygotic isolation may be caused by chromosomal rearrangements or different
487 alleles that do not function properly when brought together in hybrids (Bateson-Dobzhansky-
488 Muller - BDM - classic model of genic incompatibilities; Coyne and Orr, 1998; Rieseberg
489 and Willis, 2007). Recent hybridization studies suggest that postzygotic (BDM)
490 incompatibilities may contribute to the isolation in plants (Pinheiro *et al.*, 2010, 2015; Palma-
491 Silva *et al.*, 2011). Further studies involving other approaches such as cytogenetic analyses
492 are needed to confirm this hypothesis.

493 Few studies using molecular markers to identify hybrids in Bromeliaceae are observed
494 (Schulte *et al.*, 2010; Palma-Silva *et al.*, 2011; Zanella *et al.*, 2016). The hybridization rate
495 between *A. comata* and *A. kertesziae* (25%) was similar to *Pitcairnia albiflos* and *P. staminea*
496 (23.31%; Palma-Silva *et al.*, 2011), while hybridization rate between *A. comata* and *A.*
497 *caudata* (3.66%) was lower than observed for *Vriesea carinata* and *V. incurvata* (8.29%;
498 Zanella *et al.*, 2016) and Chilean *Puya* species (10.09%; Schulte *et al.*, 2010). Important
499 prezygotic isolation mechanisms for these bromeliads are geography, phenology, isolation
500 driven by different pollinators, and divergent mating systems (Schulte *et al.*, 2010; Palma-
501 Silva *et al.*, 2011; Zanella *et al.*, 2016).

502 ***Morphological and ecological variation***

503 Using the multivariate PCA method, the floral morphology clearly differentiated *A. comata*
504 and *A. caudata*, but there was great overlap between *A. comata* and *A. kertesziae* (Fig. 8).
505 *Aechmea kertesziae* exhibits wide morphological variation (Table S2, Supplemental
506 Information), and 34% of the individuals were classified with a floral morphology that was
507 inconsistent with its classification at the species level, based on the attribution in the field
508 (Table S5, Supplemental Information). Although the univariate analyses showed that the

509 analyzed morphological characters differentiated the three species, the great intraspecific
510 variability of *A. kertesziae* makes it overlap with *A. comata* and *A. caudata* in the multivariate
511 analysis (Fig. 8).

512 In the field, identification of putative hybrids based on morphological characters between *A.*
513 *comata* and *A. caudata* was not possible because we did not find individuals with
514 intermediate morphology between these species. We observed individuals that we thought
515 initially were of intermediate morphology between *A. comata* and *A. kertesziae* in the UCAD
516 sympatric area. However, it turns out that actually *A. kertesziae* possess great morphological
517 variability at this place. Therefore, based solely on morphological characters, it was not
518 possible to confirm whether such individuals from UCAD were hybrids or not (Fig. S2,
519 Supplemental Information), emphasizing the importance of molecular analysis for the
520 identification of hybrids.

521 All hybrids between *A. comata* and *A. caudata* showed similar morphology to *A. comata*. In
522 contrast, hybrids between *A. comata* and *A. kertesziae* showed similar morphology to both
523 parental species. Ten hybrids were identified with similar morphology to *A. comata*, while
524 seven hybrids were identified with similar morphology to *A. kertesziae* (Figs. 8 and S5,
525 Supplemental Information). Individuals with intermediate morphology between *A. comata*
526 and *A. kertesziae* observed in the UCAD sympatric zone were identified as purebred
527 individuals of *A. kertesziae* in Structure analysis.

528 Hybrids identified by the molecular analyses in this study did not present intermediate
529 morphology between the parental species. One of the most common misconceptions is that
530 hybrids are typically morphologically intermediate between their parental. The expression of
531 parental vs intermediate character states in hybrids will depend on the nature of the genetic
532 control of a particular character, as well as interactions with the environment (Rieseberg,
533 1995).

534 These results highlight the difficulty in recognizing hybrids based on morphological
535 characters solely, especially in groups that exhibit considerable morphological variability
536 (Schulte *et al.*, 2010). The results also demonstrate the inconsistency of morphology for the
537 identification of hybrids based in characters that are subject to environmental influence (Leal

538 *et al.*, 2016). Recent hybridization studies in bromeliads have demonstrated that hybrids may
539 have no intermediate morphology considering their parental species (Schulte *et al.*, 2010;
540 Zanella *et al.*, 2016). Presumably, the extent of natural hybridization in Bromeliaceae is
541 currently underestimated due to the difficulties in recognizing hybrids. To elucidate the role
542 of natural hybridization in this family, detailed studies of sympatric congeneric species are
543 needed, especially including molecular evidence (Schulte *et al.*, 2010).

544 Microhabitat analysis has demonstrated that the three species and hybrids have different
545 preferences of microhabitats (Fig. 9). However, *A. comata* presents microhabitat preferences
546 that are also found, at least in part, in the other two species here investigated. It can be
547 terrestrial or rupicolous (as *A. kertesziae* and *A. caudata*, respectively) and it either thrives in
548 environments with high or low luminosity. These results showed that *A. comata* is less
549 rigorous concerning microhabitat than the other two species. Hybrids between *A. comata* and
550 *A. caudata* showed microhabitat preferences similar to *A. comata*, which was a pattern
551 already highlighted by morphological and plastid molecular markers (hybrids resemble *A.*
552 *comata*). An interesting fact was found for the hybrids between *A. comata* and *A. kertesziae*.
553 They showed microhabitat preferences (rupicolous or epiphytic habitat and occurrence in
554 environments with low luminosity) similar to what was observed for *A. caudata*. This may
555 imply that these hybrids between *A. comata* and *A. kertesziae* could thrive in *A. caudata*
556 preferred microhabitat. More studies would be very helpful to understand this pattern.
557 Although ecological factors are clearly important in determining the spatial distribution of
558 species, in many taxa, non-ecological barriers may be key to the long-term maintenance of
559 species boundaries (Larson *et al.*, 2014).

560 ***Genetic diversity and gene flow in sympatric populations***

561 *Aechmea comata* is a species that invests in both sexual and asexual reproductive
562 mechanisms (Lenzi *et al.*, 2006), and is restricted to the Island of Santa Catarina, in which it
563 presents great abundance with few records in other regions. Comparing levels of genetic
564 diversity of *A. comata* with *A. caudata*, and *A. kertesziae* (Tables 1 and 2), and others
565 bromeliads also evaluated using microsatellite markers, this species displays one of the
566 highest diversity values, despite being an island endemic species, while others species are
567 widespread taxa (Zanella *et al.*, 2012b; Goetze *et al.*, 2015). Plants with restricted distribution

568 are expected to exhibit low genetic diversity when compared with closely related species
569 widely distributed (Cole, 2003). However, the generalization that rare species have low levels
570 of genetic variability is only part of the truth, and not always rare species present low levels
571 of genetic diversity (Gitzendanner and Soltis, 2000).

572 Several ecological factors may be important determinants of plant genetics: mode of
573 reproduction, life cycle, successional stage, and geographic range. Short-lived perennials,
574 species that are widespread, plants in late successional or those that reproduce both sexually
575 and vegetatively have the highest intraspecific diversity. Low intraspecific diversity is found
576 in sexually reproducing species, long-lived perennials, regionally distributed species, and
577 species in mid-successional stages (Loveless and Hamrick, 1984). Rare and restricted species
578 with high genetic diversity have already been observed in other plant species: e. g., *A.*
579 *winkleri* ($R_S = 3.57$ and $H_O = 0.559$; Goetze *et al.*, 2015) and *Petunia secreta* ($R_S = 5.91$ and
580 $H_O = 0.24$; Turchetto *et al.*, 2016).

581 Even comparing the levels of variability between *A. comata* and other narrow endemics
582 *Aechmea*, as *A. winkleri* (Goetze *et al.*, 2015), allelic richness and observed heterozygosity
583 values were higher for *A. comata* ($R_S = 6.23$ and $H_O = 0.674$). Corroborating the high
584 diversity found in this species, only two loci deviated from HWE, indicating low levels of
585 endogamy at species level. These results can be used as a clue to determine the mating system
586 of *A. comata*. The occurrence of mixed mating system (a percentage of selfing and other of
587 outcrossing) could explain its high genetic diversity. Lenzi *et al.* (2006) reported that *A.*
588 *comata* is a self-compatible species in a population in the southern region of the Santa
589 Catarina Island. On the other hand, Dorneles *et al.* (2011) reported that *A. comata* from
590 UCAD population is an outcrossing. More studies are needed to confirm this hypothesis of
591 *A. comata* as a mixed mating system species. The high levels of genetic variation observed
592 in *A. comata* could also be explained by the occurrence of hybridization with *A. caudata* and
593 *A. kertesziae*. In rare species, genetic variability can be increased by interspecific gene flow
594 (Stebbins, 1942).

595 Most of the populations evaluated in this study do not departed from HWE, in contrast with
596 what is observed in other bromeliad species, which exhibited an excess of homozygote
597 genotypes using microsatellite markers (Tables 3 and 4; Palma-Silva *et al.*, 2009; Goetze *et*

598 *al.*, 2015; Zanella *et al.*, 2016). The levels of heterozygosity found in the populations here
599 evaluated probably occur due to random mating among individuals.

600 According to nuclear and plastid divergence results, *A. comata* and *A. caudata* showed
601 moderate levels of genetic differentiation (nuclear: $F_{ST} = 0.199$; $G'_{ST} = 0.207$ and 28.60% of
602 genetic variation among species - AMOVA plastid results), while *A. comata* and *A. kertesziae*
603 showed low levels of nuclear genetic differentiation ($F_{ST} = 0.089$; $G'_{ST} = 0.090$ and 2.81%
604 of genetic variation among species - AMOVA plastid results). These patterns are probably a
605 consequence of higher interspecific gene flow between *A. comata* and *A. kertesziae* and
606 retention of ancestral polymorphism due to the closer genetic relationship between these
607 species (Minder and Widmer, 2008; Goetze *et al.*, 2016). Additionally, nuclear and plastid
608 microsatellite sharing may also be explained by homoplasy (alleles are identical-in-state (IIS)
609 without being identical-by-descent (IBD); Jarne and Lagoda, 1996). The determination of
610 the percentage of variation that occurs due to hybridization, ancestral polymorphism or
611 homoplasy is a challenging task (Zanella *et al.*, 2016).

612 Similarly, low levels of interspecific gene flow as reported here ($N_{em} = 0.10-0.59$; Figs. 4
613 and 5), have also been found for other sympatric bromeliads species: *Pitcairnia albiflos* and
614 *P. staminea* ($N_{em} = 0.15-0.35$; Palma-Silva *et al.*, 2011), *Vriesea carinata* and *V. incurvata*
615 ($N_{em} = 0.13-0.32$; Zanella *et al.*, 2016) and a complex of *Alcantarea* species ($N_{em} = 0.071-$
616 0.322 ; Lexer *et al.*, 2016).

617 ***Maintenance of species boundaries in A. comata: pre- or postzygotic barriers?***

618 Exactly what the species boundary represents is not always so clear. We might consider the
619 species boundary to be defined by the phenotypes/genes/genome regions (or some subset
620 thereof) that remain differentiated in face of potential hybridization and introgression, when
621 the entities in question are locally sympatric (Harrison and Larson, 2014). The existence of
622 species in sexual taxa could depend on both distinct adaptive peaks (adaptation to distinct
623 niches) and reproductive isolation. Several isolating mechanisms act together to both prevent
624 gene flow in sympatry and allow coexistence (Coyne and Orr, 1998; Rieseberg and Willis,
625 2007).

626 Two or more congeneric species with overlapping blooming periods is common in the
627 Bromeliaceae family (Wendt *et al.*, 2001, 2002, 2008; Matallana *et al.*, 2010, 2016; Palma-
628 Silva *et al.*, 2011; Zanella *et al.*, 2016) and, probably, this sympatric occurrence may increase
629 pollinator abundance. However, associated with the increased pollinator service in mixed
630 populations, there is the potential for increased interspecific pollen transfer. Therefore, the
631 existence of effective isolation barriers between sympatric species of Bromeliaceae should
632 be expected (Wendt *et al.*, 2008).

633 Previous evidence suggested inefficient prezygotic isolation mechanisms (phenological,
634 spatial, microhabitat differences and pollinator specificity) for some bromeliad species,
635 including the genus *Aechmea* (Wendt *et al.*, 2001, 2008; Matallana *et al.*, 2010). Artificial
636 hybrids are easily created between bromeliad species through hand pollination (Wendt *et al.*,
637 2011; 2002; Wagner *et al.*, 2015; Matallana *et al.*, 2016). This fact suggests that postzygotic
638 reproductive isolation barriers are also potentially weak (Wendt *et al.*, 2008).

639 The three *Aechmea* species studied here overlap flowering times, share one pollinator (the
640 bee *B. morio*; Lenzi *et al.*, 2006; Kamke *et al.*, 2011; M. Büttow, unpubl. res.) and are found
641 in sympatry in Santa Catarina Island. Despite an overlapping in flowering time for the three
642 species, *A. comata* and *A. kertesziae* present the blossom peak at the same time. The different
643 phenologies between *A. comata* and *A. caudata* may play a role in prezygotic isolation, while
644 between *A. comata* and *A. kertesziae* this prezygotic isolation does not exist.

645 Despite the three species have similar floral morphology and share one pollinator, *A. comata*
646 presents two effective non-shared pollinators, the hummingbirds *Amazilia fimbriata* Elliot
647 (Trochilinae) and *Thalurania glaucopis* Gmelin (Trochilinae) (Lenzi *et al.*, 2006; Dorneles
648 *et al.*, 2011). These pollinators can promote large intraspecific gene flow in *A. comata* and
649 limit interspecific gene flow with *A. caudata* and *A. kertesziae* (Lenzi *et al.*, 2006; Dorneles
650 *et al.*, 2011). This characteristic could also be a potential prezygotic isolation between these
651 species.

652 The evolution of self-compatibility in part occurs because self-incompatibility alleles are lost
653 by genetic drift in small populations (Frankham *et al.*, 2010). Self-compatibility has been
654 described as a potential prezygotic barrier in bromeliads, restricting gene flow and

655 hybridization among populations/species (Wendt *et al.*, 2002; Matallana *et al.*, 2010; Palma-
656 Silva *et al.*, 2015). Although our results did not show an excess of homozygote genotypes
657 for *A. comata* (Tables 3 and 4), self-compatibility could contribute to the reproductive
658 isolation for this species. This become particularly interesting because populations of *A.*
659 *comata* located in the southern portion of Santa Catarina Island, and thus close to the PMLL
660 sympatric area evaluated here, are described as self-compatible (Lenzi *et al.*, 2006).
661 Therefore, this could also act as a prezygotic barrier between *A. comata* and *A. caudata*,
662 explaining why only one hybrid was identified by Structure analysis in this area (Fig. 2). On
663 the other hand, populations of *A. comata* from UCAD were identified as self-incompatible
664 (Dorneles *et al.*, 2011), and thus may be more sensitive to interspecific gene flow.

665 As discussed above, it is likely that a set of prezygotic barriers, as phenological and
666 ethological isolation, self-compatibility, and perhaps postzygotic RI barriers, as low viability
667 or sterility of hybrids, postzygotic Bateson-Dobzhanky-Muller incompatibilities are involved
668 in maintaining species integrity of *A. comata*, *A. caudata*, and *A. kertesziae*. The presence of
669 reproductive isolation mechanisms allows coexistence of these species in sympatry, ensuring
670 the maintenance of species boundary in *A. comata* despite of interspecific gene flow with *A.*
671 *caudata* and *A. kertesziae*. Species boundaries among these *Aechmea* species are
672 semipermeable with some gene flow in sympatric areas. According to a genic view of
673 speciation (Wu, 2001), reproductive isolation is a consequence of differences in adaptation,
674 controlled by a moderate number of individual genes, rather than the whole genome.
675 Although alleles at these loci will not move between species, it is feasible that there will be
676 interspecific gene flow at other loci.

677 ***Conclusions and conservation implications***

678 The patterns of genetic (nuclear and cpDNA), morphological, and ecological (microhabitat)
679 variation found here are coincident with species delimitation. Although gene flow was
680 observed in the sympatric areas, and *A. comata* demonstrated reproductive compatibility with
681 *A. caudata* and *A. kertesziae* in artificial crosses, it is likely that a set of barriers both pre-
682 and postzygotic, are responsible for maintaining the integrity of the species. However, for *A.*
683 *kertesziae*, our morphological analyses revealed a great variation in the four characters here
684 evaluated. It was also revealed that misidentifications for this species are higher than for the

685 other two. Therefore, an urgent morphological review, especially for *A. kertesziae* is needed
686 to better understand the morphological polymorphisms presented by this species. Allied to
687 this, hybrids can not be identified solely based on morphology, which demonstrate the care
688 that must be taken when considering this group of species.

689 Although *A. comata* is a rare species, restricted to the Santa Catarina Island, it has
690 demonstrated the highest genetic diversity already reported for bromeliads. *Aechmea caudata*
691 showed low levels of genetic diversity and this species was recommended to be included in
692 the Official List of Endangered Brazilian Flora Species by Goetze *et al.* (2013), due small
693 population sizes and few populations in nature. *Aechmea kertesziae* is an endemic species of
694 Santa Catarina (Reitz, 1983) and was considered in danger of extinction by the Red Book of
695 Brazilian Flora (Forzza *et al.*, 2013). Nevertheless, these species deserve special attention
696 from the agencies involved with the implementation of conservation programs of the
697 Brazilian Atlantic Forest because they are rare or in danger.

698 Hybridization processes can represent a risk to the maintenance of parental species,
699 especially when the hybrids possess higher fitness. It was not possible in the presented study
700 to evaluate if introgression is going on, and if so, in what extent, due to the low genetic
701 differentiation levels found among species. Therefore, more studies using a higher number
702 of microsatellites or other kind of markers, as SNPs, should be carried out to understand the
703 threat that the hybridization process here identified might cause to *A. comata*, *A. caudata*,
704 and *A. kertesziae*.

LITERATURE CITED

Abbott R, Albach D, Ansell S et al. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **26**:229-246.

Abondanza BF. 2012. *Revisão taxonômica do complexo Aechmea coelestis (K. Koch) e Morren (Bromeliaceae)*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente, São Paulo.

Abramson JH. 2004. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic Perspectives and Innovations* **1**:6.

Anderson EC, Thompson EA. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**:1217–1229.

Aoki-Gonçalves F, Louzada RB, De Souza LM, Palma-Silva C. 2014. Microsatellite loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to neotropical rock outcrops. *Applications in Plant Sciences* **2**:1–4.

Bandelt HJ, Forster P, Roehl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**:37–48.

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.

Burgarella C, Lorenzo Z, Jabbour-Zahab R et al. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity* **102**:442–452.

Büttow MV. 2012. *Estudo do sucesso reprodutivo, dos padrões de cruzamento e do fluxo de pólen em Aechmea winkleri, uma espécie endêmica do sul do Brasil*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Cafasso D, Widmer A, Cozzolino S. 2005. Chloroplast DNA inheritance in the orchid *Anacamptis palustris* using single seed polymerase chain reaction. *Journal of Heredity* **96**:66–70.

Capra F. 2012. *Diversidade e estruturação genética em populações de Aechmea kertesziae (Bromeliaceae), uma espécie endêmica de Santa Catarina.* Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Cole CT. 2003. Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **34**:213–237.

Coyne JA, Orr HA. 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **353**:287–305.

Coyne JA, Orr HA. 2004. *Speciation.* Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Dieringer D, Schlötterer C. 2003. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3**:167–169.

Dobzhansky T. 1970. *Genetics of the evolutionary process.* Columbia Univ. Press, New York.

Dorneles LL, Zillikens A, Harter-Marques B, Steiner J. 2011. Effective pollinators among the diverse flower visitors of the Bromeliad *Aechmea lindenii* in south Brazilian Atlantic Rain Forests. *Entomologia Generalis* **33**:149-164.

Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.

Earl DA, von Holdt BM. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**:359–361.

Eliades NG, Eliades DG. 2009. *HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data.* Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the numbers of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**:2611–2620.

Evans TM, Jabaily RS, Faria APG, Sousa LOF, Wendt T, Brown GK. 2015. Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on Plastid DNA sequence data. *Systematic Botany* **40**:116–128.

Excoffier L, Laval LG, Schneider S. 2005. ARLEQUIN, version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**:47–50.

Faria APG, Wendt T, Brown GK. 2004. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **91**:303-319.

Faria APG, Wendt T, Brown GK. 2010. A revision of *Aechmea* subgenus *Macrochordion* (Bromeliaceae) based on phenetic analyses of morphological variation. *Botanical Journal of the Linnean Society* **162**:1-27.

Forzza RC, Costa AF, Leme EMC et al. 2013. Bromeliaceae In: Marinelli G and Moraes MA (Org.) *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jacobson, 319.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press.

Gitzendanner MA, Soltis PS. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* **87**:783-792.

Goetze M. 2010. *Filogeografia e diversidade genética de Aechmea caudata (Lindm.) e A. winkleri (Reitz) (Bromeliaceae): implicações taxonômicas*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Goetze M. 2014. *Especiação e diversidade genética no subgênero Ortgiesia (Aechmea, Bromeliaceae)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Goetze M, Buttow MV, Zanella CM et al. 2015. Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* **58**:204–210.

Goetze M, K Schulte, C Palma-Silva et al. 2016. Diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae) in the Brazilian Atlantic rainforest: a case study in *Aechmea* subgenus *Ortgiesia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **98**:346-357.

Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C. 2013. Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochemical Systematics and Ecology*, **48**:194–198.

Gouda EJ, Butcher D, Gouda CS. Cont.updated. *Encyclopaedia of Bromeliads, Version 3*. <http://encyclopedia.florapix.nl/>. University Botanic Gardens, Utrecht (accessed: 03/10/2016).

Goudet J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**:485–486.

Harrison RG. 1993. Hybrids and Hybrid zones: Historical Perspective In: Harrison RG (ed.) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Oxford, 3-11.

Harrison RG, Larson EL. 2014. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity* **105**:795–809.

Hedrick P. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* **59**:1633–1638.

Jarne P, Lagoda P. 1996. Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**:424–429.

Kamke R, Schmid S, Zillikens A, Lopes BC, Steiner J. 2011. The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. *Flora* **206**:749-756.

Kimura M, Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Science* **75**:2868–2872.

Krapp F, Wöhrmann T, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K. 2012.

A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. *American Journal of Botany*, e470-e473.

Larson EL, White TA, Ross C, Harrison RG. 2014. Gene flow and the maintenance of species boundaries. *Molecular Ecology* **23**:1668-1678.

Leal BSS, Chaves CJN, Koehler S, Borba E. 2016. When hybrids are not hybrids: a case study of a putative hybrid zone between *Cattleya coccinea* and *C. brevipedunculata* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**:621-639.

Lenzi M, Matos JZ, Orth AI. 2006. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var: *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica* **20**:487-500.

Lexer C, Marthaler F, Humbert S et al. 2016. Gene flow and diversification in a species complex of *Alcantarea* inselberg bromeliads. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**:505-520.

Loveless MD, Hamrick JL. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **15**:65-96.

Matallana G, Da Silva PR, Oliveira PE, Wendt T. 2016. Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**:521–531.

Matallana G, Godinho MA, Guilherme FAG, Belisario M, Coser TS, Wendt T. 2010. Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Systematics and Evolution* **289**:57–65.

Mayr E. 1963. *Animal species and evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

Minder AM, Widmer A. 2008. A population genomic analysis of species boundaries: neutral processes, adaptive divergence and introgression between two hybridizing plant species. *Molecular Ecology* **17**:1552–1563.

Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T et al. 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vreisea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliads species. *Molecular Ecology Notes* **7**:654–657.

Palma-Silva C, Cozzolino S, Paggi GMG, Lexer C, Wendt T. 2015. Mating system variation and assortative mating of sympatric bromeliads (*Pitcairnia* spp.) endemic to Neotropical inselbergs. *American Journal of Botany* **102**:758–764.

Palma-Silva C, Leal BSS, Chaves CJN, Fay MF. 2016. Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**:305–322.

Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM; Barbará, T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vreisea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* **103**:503–512.

Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F et al. 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* **20**:3185–3201.

Polzin, T, Daneschmand SV. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* **31**:12-20.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945–959.

Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**:248–249.

Reitz R. 1983. *Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica*. Flora Ilustrada Catarinense, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.

Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science* **317**:910–914.

Rieseberg LH. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**:944–953.

Rieseberg LH, Church SA, Morjan CL. 2004. Integration of populations and differentiation of species. *New Phytologist* **61**:59–69.

Rios PAF, Neto JCA, Ferreira VM, Neves MIRS. 2016. Seed morphometry and germination of *Aechmea costantinii* (mez) L. B. Sm. (bromeliaceae). *Caatinga* **26**:85-93.

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* **57**:1105– 1119.

Scopate G, Musacchio A, Widmer A, Cozzolino S. 2007. Patterns of reproductive isolation in Mediterranean deceptive orchids. *Evolution* **61**:2623–2642.

Scopece G, Widmer A, Cozzolino S. 2008. Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. *American Naturalist* **171**:315–326.

Silvestro D, Zizka G, Schulte K. 2014. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution* **68**:163-175.

Smith LB, Downs RJ. 1979. *Flora Neotrópica: monography 14, Part 3 – Bromelioideae (Bromeliaceae)*. The New York Botanical Garden, Hafner Press, New York, 1493-2142.

Stebbins GL. 1942. The genetic approach to problems of rare endemic species. *Modroño* **6**:241–272.

Turchetto C, Segatto ALA, Mäder G, Rodrigues DM, Bonatto SL, Freitas LB. 2016. High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: implications for conservation. *AoB Plants* **8**:8.

Vähä JP, Primmer CR. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* **15**:63–72.

Wagner ND, Wöhrmann T, Öder V, Burmeister A, Weising K. 2015. Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: a case study in *Fosterella* (Pitcairnioideae). *Plant Systematics and Evolution* **301**:2231–2246.

Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**:1358–1370.

Wendt T, Canela MBF, Faria APG, Rios RI. 2001. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **88**:1760–1767.

Wendt T, Canela MBF, Klein DE, Rios RI. 2002. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **232**:201–212.

Wendt T, Coser TS, Matallana G, Guilherme FAG. 2008. An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **275**:31–41.

Wöhrmann T, Weising K. 2011. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theoretical and Applied Genetics* **123**:635-647.

Wöhrmann T, Wagner N, Krapp F, Huettel B, Weising K. 2012. Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *American Journal of Botany*, e160-e163.

Wu CI. 2001. The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **14**:851–865.

Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis MS, Bered F. 2012a. Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in others bromeliads. *Internacional Journal of Molecular Sciences* **13**:15859-15866.

Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F. 2012b. Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* **35**:1020e1026.

Zanella CM, Palma-Silva C, Goetze M, Bered F. 2016. Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**:491-504.

Table 1. Genetic variability at ten nuclear microsatellite loci in *Aechmea comata*, *A. caudata* and hybrids, including locus name, number of alleles (A), allelic richness (R_s), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, and inbreeding coefficient (F_{IS}) for each locus.

Locus	<i>A. comata</i>					Hybrids					<i>A. caudata</i>				
	A	R_s	H_o	H_e	F_{IS}	A	R_s	H_o	H_e	F_{IS}	A	R_s	H_o	H_e	F_{IS}
Acom 91.2	10	3.95	0.804	0.802	-0.003	2	2.00	0.667	0.533	-0.333	5	2.99	0.630	0.676	0.070
Acom 82.8	16	4.59	0.634	0.888	0.286*	4	4.00	0.667	0.867	0.273	8	3.60	0.366	0.767	0.526*
Ac01	9	4.12	0.761	0.844	0.099	2	2.00	0.333	0.333	0.000	4	3.11	0.519	0.713	0.275*
Acom 78.4	6	2.91	0.645	0.667	0.033	3	3.00	0.667	0.733	0.111	6	3.28	0.453	0.735	0.387*
Op92	13	3.61	0.462	0.762	0.396*	3	3.00	0.333	0.600	0.500	4	2.63	0.434	0.577	0.249
Acom 12.12	6	2.53	0.467	0.597	0.219	2	2.00	0.333	0.333	0.000	3	1.42	0.115	0.146	0.209
Op77	12	3.19	0.685	0.651	-0.052	4	4.00	0.667	0.867	0.273	4	2.22	0.170	0.457	0.630*
Ao06	5	2.67	0.587	0.618	0.051	3	3.00	1.000	0.800	-0.333	2	1.97	0.093	0.496	0.815*
NgFos22	7	2.58	0.684	0.602	-0.137	2	2.00	0.333	0.333	0.000	2	1.06	0.019	0.019	0.000
Ac25	11	3.71	0.707	0.787	0.103	3	3.00	1.000	0.733	-0.500	4	2.61	0.365	0.608	0.402*
Overall/Mean	95	3.39	0.644	0.722	0.099*	28	2.80	0.600	0.613	-0.001	42	2.49	0.316	0.519	0.356*

Inbreeding coefficients (F_{IS}) that departed significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) are indicated by asterisks (* $P < 0.001$).

Table 2. Genetic variability at ten nuclear microsatellite loci in *Aechmea comata*, *A. kertesziae* and hybrids, including locus name, number of alleles (A), allelic richness (R_s), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, and inbreeding coefficient (F_{IS}) for each locus.

Locus	<i>A. comata</i>					Hybrids					<i>A. kertesziae</i>				
	A	R_s	H_o	H_e	F_{IS}	A	R_s	H_o	H_e	F_{IS}	A	R_s	H_o	H_e	F_{IS}
Acom 91.2	10	8.38	0.791	0.822	0.038	8	7.64	0.824	0.818	-0.007	7	6.41	0.604	0.689	0.124
Acom 82.8	14	9.62	0.794	0.883	0.101	11	10.60	0.765	0.886	0.141	14	12.10	0.891	0.922	0.033
Ac01	8	6.57	0.746	0.833	0.105	7	6.86	0.647	0.804	0.200*	11	8.82	0.571	0.856	0.335*
Acom 78.4	4	3.76	0.565	0.630	0.104	5	4.87	0.824	0.674	-0.231	6	5.07	0.776	0.744	-0.043
Op92	11	7.77	0.464	0.711	0.349*	4	3.87	0.294	0.401	0.273	6	4.26	0.250	0.364	0.315*
Acom 12.12	6	4.17	0.687	0.650	-0.057	4	3.99	0.647	0.686	0.059	5	3.72	0.510	0.556	0.084
Op77	12	7.37	0.677	0.692	0.021	9	9.00	0.600	0.825	0.280	7	6.13	0.540	0.657	0.179*
Ao06	5	3.97	0.603	0.600	-0.006	3	2.88	0.412	0.540	0.243	2	2.00	0.440	0.389	-0.134
NgFos22	8	4.32	0.786	0.597	-0.320	3	2.88	0.647	0.544	-0.197	5	3.11	0.280	0.337	0.171
Ac25	8	6.36	0.623	0.754	0.174	8	7.75	0.765	0.809	0.057	8	6.69	0.745	0.791	0.059
Overall/Mean	86	6.23	0.674	0.717	0.051*	62	6.04	0.642	0.699	0.082*	71	5.83	0.561	0.630	0.112*

Inbreeding coefficients (F_{IS}) that departed significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) are indicated by asterisks (* $P < 0.001$).

Table 3. Genetic characterization of populations of *Aechmea comata*, *A. caudata* and hybrids, with ten nuclear microsatellite markers and six plastid microsatellite markers, including number of alleles (A), number of private alleles (Ap), allelic richness (R_s), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, inbreeding coefficient (F_{IS}), sample size (N), number of haplotypes (NH), and haplotype diversity (HD).

Species/populations (sample size)	Nuclear microsatellites						Plastid microsatellites			
	A	Ap	R_s	H_O	H_E	F_{IS}	N	Haplotypes (frequency)	NH	HD
Allopatric										
<i>A. comata</i> – Daniela-SC (23)	64	6	2.68	0.692	0.713	0.016	23	H1a (1), H2a (1), H6a (1), H7a (1), H8a (5), H9a (1), H10a (1), H11a (1), H12a (1), H13a (1), H14a (3), H15a (2), H16a (1), H17a (1), H34a (2)	15	0.941
<i>A. comata</i> – Praia dos Ingleses-SC (23)	54	3	2.37	0.621	0.611	-0.041	20	H34a (5), H35a (3), H36a (1), H37a (2), H38a (2), H39a (1), H40a (2), H41a (1), H42a (1), H43a (2)	10	0.916
<i>A. caudata</i> – Caminho do Rei-SC (24)	29	2	1.94	0.348	0.454	0.226*	24	H19a (12), H20a (6), H21a (1), H32a (3), H33a (1), H50a (1)	6	0.696
Sympatric zones										
PMLL -SC										
<i>A. comata</i> (22)	61	9	2.62	0.632	0.687	0.079*	21	H18a (1), H44a (3), H45a (1), H46a (7), H47a (4), H48a (4), H49a (1)	7	0.829
<i>A. caudata</i> (26)	28	0	1.81	0.293	0.405	0.222*	26	H19a (10), H20a (9), H21a (1), H50a (3), H51a (3)	5	0.732
Hybrid (1)	18	0	1.80	0.800	0.800	0.000	1	H47a (1)	1	0.000
Moçambique-SC										
<i>A. comata</i> (27)	66	9	2.52	0.634	0.663	0.038	25	H3a (1), H4a (7), H5a (1), H13a (1), H17a (1), H24a (2), H25a (3), H26a (4), H27a (1), H29a (1), H30a (1), H34a (1), H31a (1)	13	0.913
<i>A. caudata</i> (4)	17	0	1.53	0.342	0.293	-0.033	4	H20a (1), H22a (1), H23a (1), H52a (1)	4	1.000
Hybrids (2)	21	0	2.10	0.500	0.483	-0.050	2	H25a (1), H28a (1)	2	1.000
Overall = 152 individuals							Overall = 146 individuals			

Inbreeding coefficients (F_{IS}) that departed significantly from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) are indicated by asterisks ($*P < 0.001$). PMLL: Parque Municipal Lagoinha do Leste, SC: Brazilian Federal state of Santa Catarina.

Table 4. Genetic characterization of populations of *Aechmea comata*, *A. kertesziae* and hybrids, with ten nuclear microsatellite markers and six plastid microsatellite markers, including number of alleles (A), number of private alleles (Ap), allelic richness (R_s), observed (H_o) and expected (H_E) heterozygosities, inbreeding coefficient (F_{IS}), sample size (N), number of haplotypes (NH), and haplotype diversity (HD).

Species/populations (sample size)	Nuclear microsatellites						Plastid microsatellites			
	A	Ap	R_s	H_o	H_E	F_{IS}	N	Haplotypes (frequency)	NH	HD
Allopatric										
<i>A. comata</i> – Daniela-SC (23)	64	5	2.68	0.692	0.713	0.016	23	H3b (1), H4b (1), H6b (1), H7b (1), H8b (5), H9b (1), H10b (1), H11b (1), H12b (1), H13b (1), H14b (3), H15b (2), H16b (1), H17b (1), H29b (2)	15	0.941
<i>A. comata</i> – Praia dos Ingleses-SC (23)	54	3	2.37	0.621	0.611	-0.041	20	H29b (5), H30b (2), H31b (1), H32b (2), H33b (2), H34b (1), H35b (2), H36b (1), H37b (2), H38b (2)	20	0.916
<i>A. kertesziae</i> – Laguna-SC (25)	51	4	2.23	0.505	0.531	0.148*	22	H17b (1), H19b (1), H22b (4), H23b (5), H24b (5), H25b (1), H26b (1), H27b (1), H28b (1), H29b (1), H37b (1)	11	0.887
Sympatric zones										
MLC -SC										
<i>A. comata</i> (3)	34	0	2.74	0.833	0.730	-0.207	3	H5b (1), H19b (1), H39b (1)	3	1.000
<i>A. kertesziae</i> (8)	28	0	1.96	0.563	0.448	-0.217	7	H9 (5), H18 (2)	2	0.476
Hybrids (3)	32	0	2.64	0.633	0.713	0.095	3	H9b (1), H20b (1), H21b (1)	3	1.000
UCAD -SC										
<i>A. comata</i> (21)	65	4	2.63	0.690	0.701	0.008	21	H32b (2), H40b (1), H41b (1), H42b (3), H43b (1), H44b (1), H47b (1), H49b (1), H50b (1), H51b (1), H57b (2), H58b (3), H59b (1), H60b (1), H62b (1)	15	0.962
<i>A. kertesziae</i> (18)	50	4	2.45	0.633	0.640	0.007*	16	H1b (1), H46b (1), H52b (1), H53b (3), H54b (7), H55b (1), H56b (1), H61b (1)	8	0.800
Hybrids (14)	57	1	2.64	0.645	0.699	0.086	13	H2b (1), H33b (1), H44b (1), H45b (1), H48b (1), H53b (2), H54b (1), H57b (2), H61b (1), H62b (2)	10	0.962
Overall = 138 individuals							Overall = 128 individuals			

Inbreeding coefficients (F_{IS}) that departed significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) are indicated by asterisks (* $P < 0.001$). MLC: Morro da Lagoa da Conceição; UCAD: Unidade de Conservação Ambiental Desterro; SC: Brazilian Federal state of Santa Catarina.

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) for ten nuclear microsatellites (nuSSR) and six plastid microsatellites (cpSSR), including only pure individuals of *Aechmea comata* and *A. caudata*.

Source of variation	Percentage of variation	F statistics	P-value
nuSSR			
Among species	15.83	$F_{CT} = 0.158$	< 0.001
Among populations within species	12.68	$F_{ST} = 0.285$	< 0.001
Within populations	71.49	$F_{SC} = 0.150$	< 0.001
cpSSR			
Among species	28.60	$F_{CT} = 0.286$	< 0.01
Among populations within species	34.42	$F_{ST} = 0.630$	< 0.001
Within populations	36.98	$F_{SC} = 0.482$	< 0.001

Table 6. Analysis of molecular variance (AMOVA) for ten nuclear microsatellites (nuSSR) and six plastid microsatellites (cpSSR), including only pure individuals of *Aechmea comata* and *A. kertesziae*.

Source of variation	Percentage of variation	F statistics	P-value
nuSSR			
Among species	5.15	$F_{CT} = 0.052$	< 0.01
Among populations within species	11.09	$F_{ST} = 0.162$	< 0.001
Within populations	83.76	$F_{SC} = 0.117$	< 0.001
cpSSR			
Among species	2.81	$F_{CT} = 0.025$	n.s.
Among populations within species	44.93	$F_{ST} = 0.453$	< 0.001
Within populations	52.26	$F_{SC} = 0.439$	< 0.001

Table 7. Results obtained from intraspecific and interspecific cross-pollination experiments of *Aechmea comata*, *A. caudata*, and *A. kertesziae*, including the number of pollinated flowers, number and percentage of fruits produced with seed (FP%), seed viability, and estimates of the strength of different stages of prezygotic (fruit formation) and postzygotic isolation (embryo mortality).

Pollen recipient	Pollen donor	Flowers	Fruits	FP %	Number of seeds	Seed viability (%)	Prezygotic Isolation	Postzygotic Isolation
Intraspecific cross-pollination								
<i>A. comata</i>	<i>A. comata</i>	6	6	100	182	84.62	-	-
<i>A. caudata</i>	<i>A. caudata</i>	5	5	80	75	88	-	-
<i>A. kertesziae</i>	<i>A. kertesziae</i>	8	7	87.5	52	92.31	-	-
Interspecific cross-pollination								
<i>A. comata</i>	<i>A. caudata</i>	11	10	91	135	52.59	0.30	0.14
<i>A. caudata</i>	<i>A. comata</i>	12	6	50	186	95.7		
<i>A. kertesziae</i>	<i>A. comata</i>	12	9	75	98	95.92	0.07	0.00
<i>A. comata</i>	<i>A. kertesziae</i>	3	3	100	70	97.14		

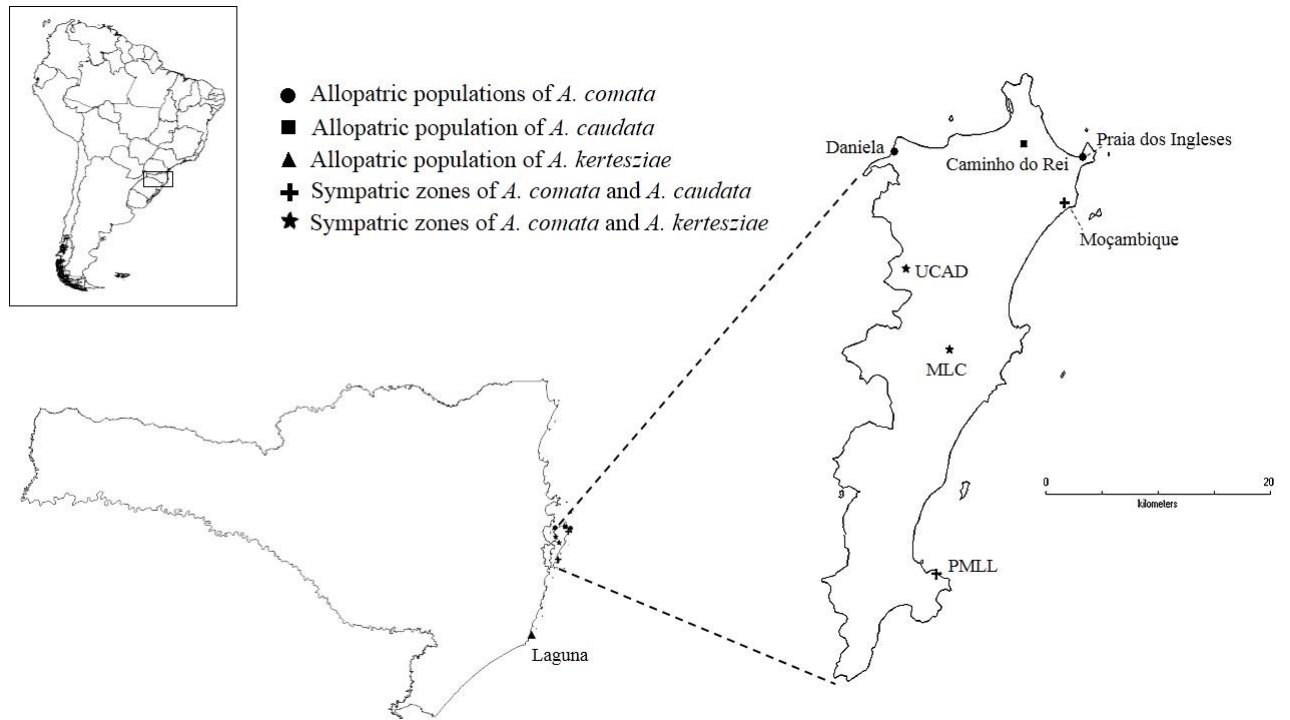


Figure 1. Map showing the geographical distribution of the four allopatric populations and four sympatric areas sampled of *Aechmea comata*, *A. caudata* and *A. kertesziae*. UCAD: Unidade de Conservação Ambiental Desterro, PMLL: Parque Municipal Lagoinha do Leste; MLC: Morro da Lagoa da Conceição.

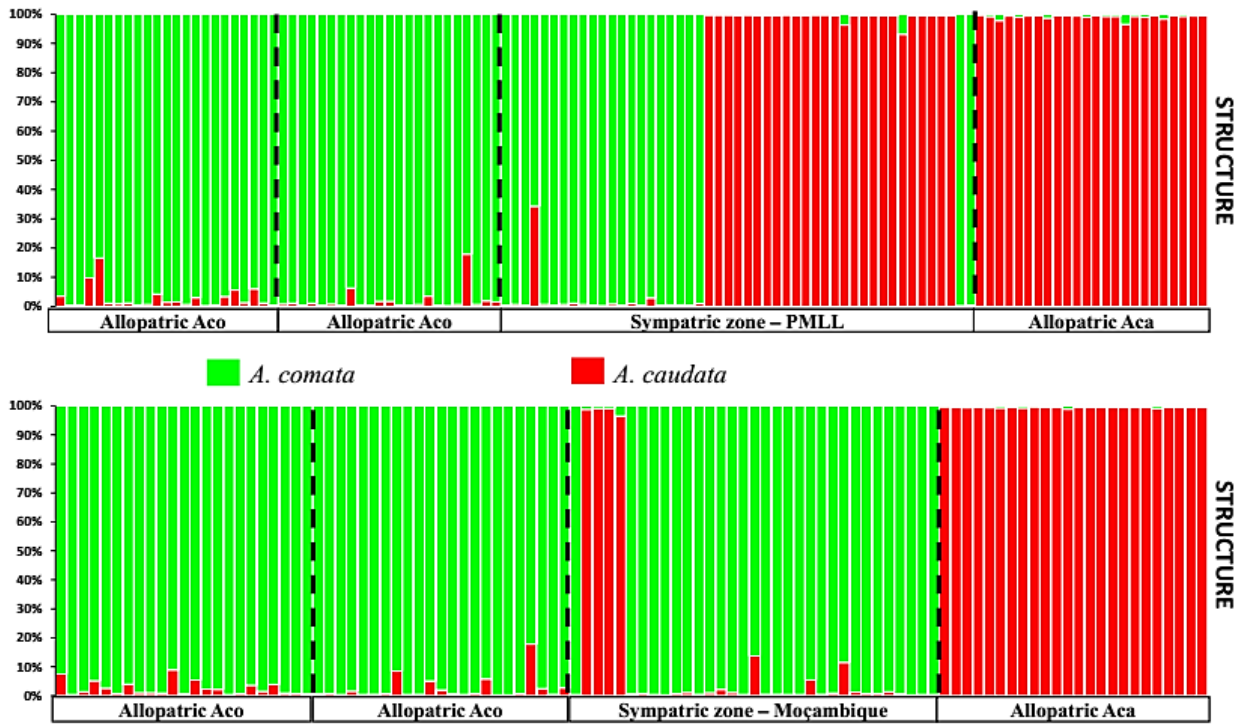


Figure 2. Posterior probabilities (q) for PMLL (Parque Municipal Lagoinha do Leste) and Moçambique sympatric areas analyzed with Structure. The proportion of colors in each bar represents the assignment probability of an individual, corresponding to *Aechmea comata* (green, $q \leq 0.10$), *A. caudata* (red, $q \geq 0.90$) and hybrids ($0.10 \leq q \leq 0.90$) in the sympatric areas.

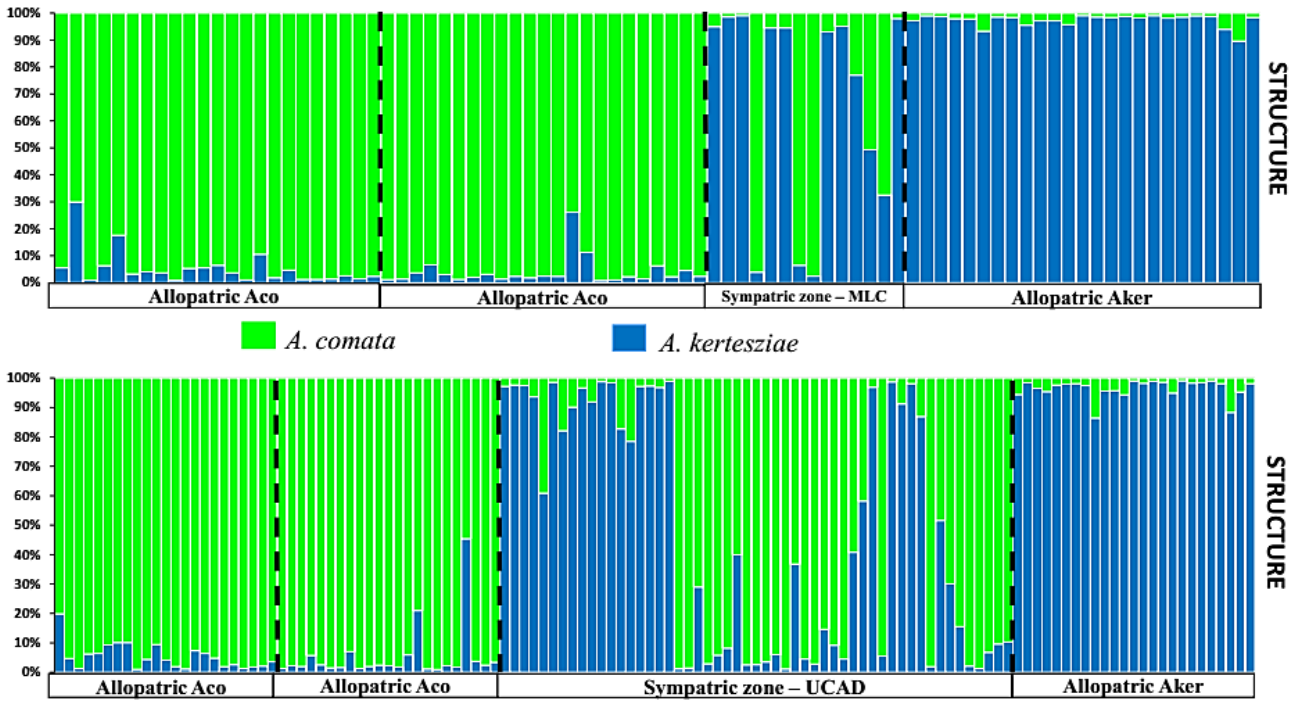


Figure 3. Posterior probabilities (q) for MLC (Morro da Lagoa da Conceição) and UCAD (Unidade de Conservação Ambiental Desterro) sympatric areas analyzed with Structure. The proportion of colors in each bar represents the assignment probability of an individual, corresponding to *Aechmea comata* (green, $q \leq 0.10$), *A. kertesziae* (blue, $q \geq 0.90$) and hybrids ($0.10 \leq q \leq 0.90$) in the sympatric areas.

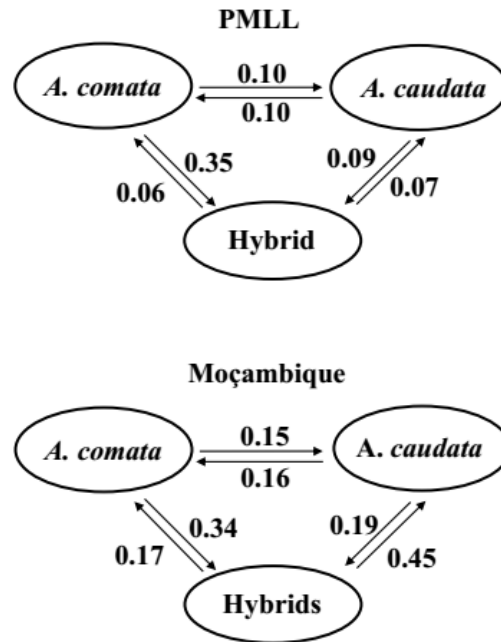


Figure 4. Bidirectional migration rates (effective number of migrants, N_{em}) between *Aechmea comata*, *A. caudata*, and hybrids from two sympatric areas, PMLL (Parque Municipal Lagoinha do Leste) and Moçambique.

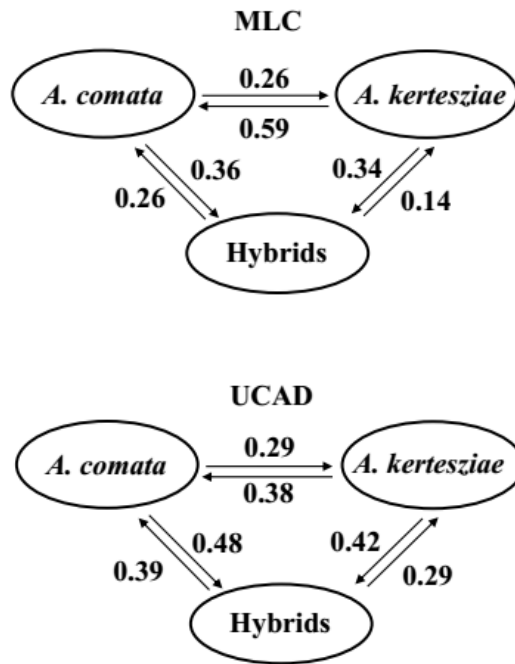


Figure 5. Bidirectional migration rates (effective number of migrants, N_{em}) between *Aechmea comata*, *A. kertesziae*, and hybrids from two sympatric areas, MLC (Morro da Lagoa da Conceição) and UCAD (Unidade de Conservação Ambiental Desterro).

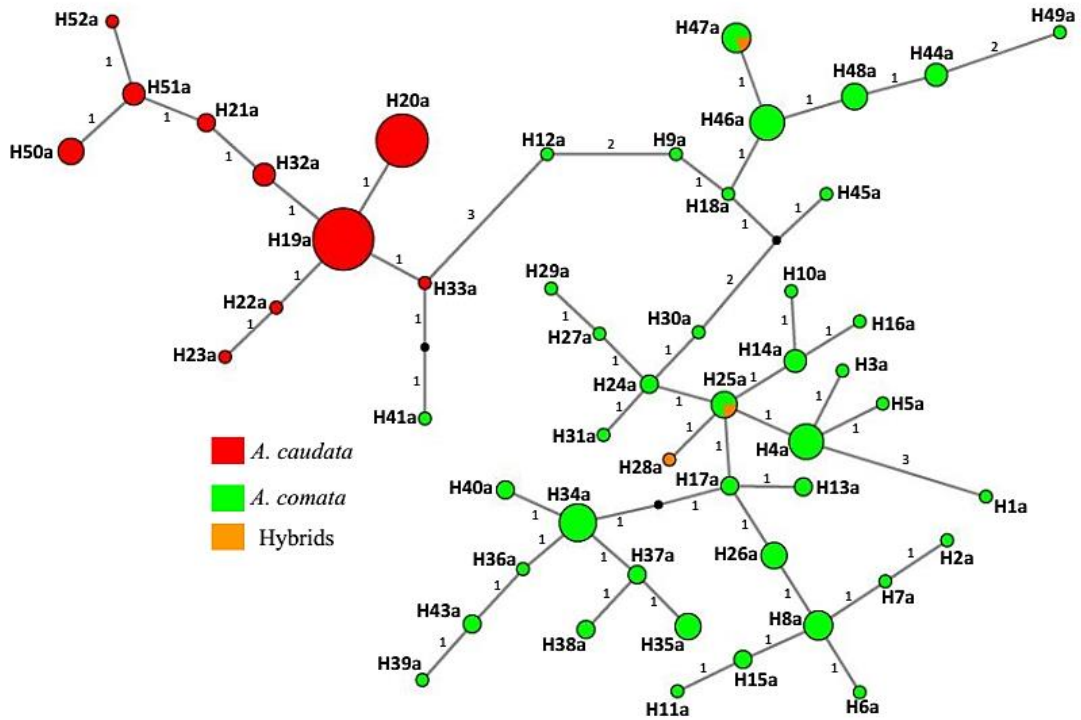


Figure 6. Median-joining network among plastid DNA haplotypes for *Aechmea comata* and *A. caudata* based on six plastid microsatellite markers. The haplotypes are indicated by the circles, the size of each circle being proportional to the observed frequency of each haplotype. The colors indicate the individuals classified as pure parental species and hybrids. Lines draw between haplotypes represent mutation events and the numbers identify how many mutations were observed.

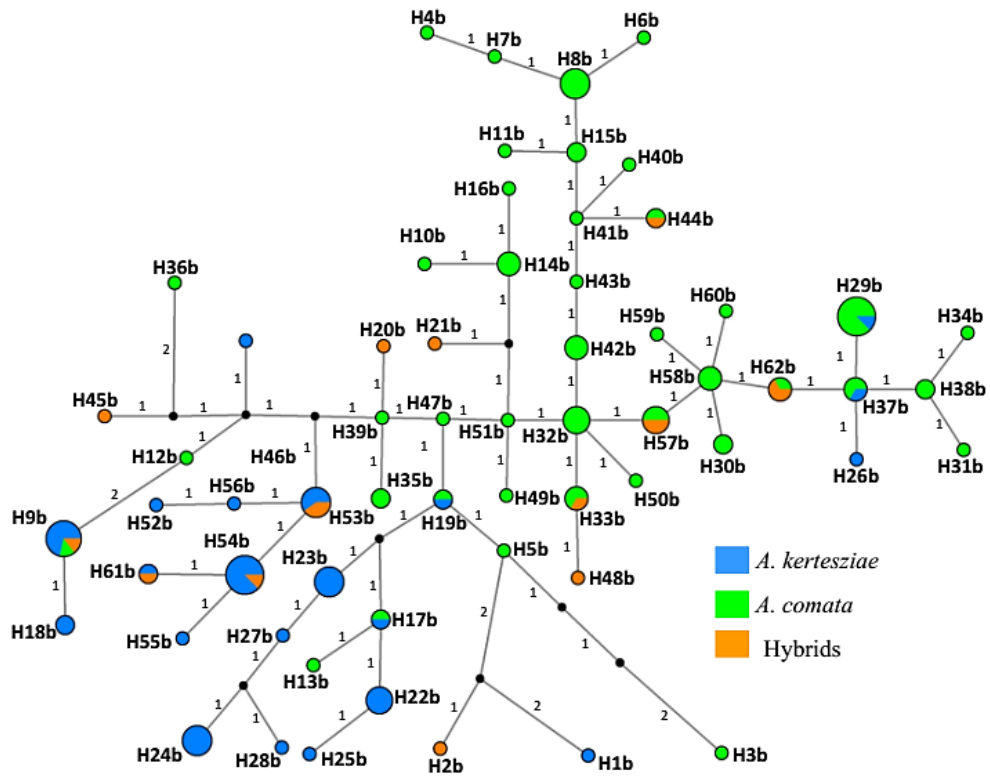


Figure 7. Median-joining network among plastid DNA haplotypes for *Aechmea comata* and *A. kertesziae* based on six plastid microsatellite markers. The haplotypes are indicated by the circles, the size of each circle being proportional to the observed frequency of each haplotype. The colors indicate the individuals classified as pure parental species and hybrids. Lines draw between haplotypes represent mutation events and the numbers identify how many mutations were observed.

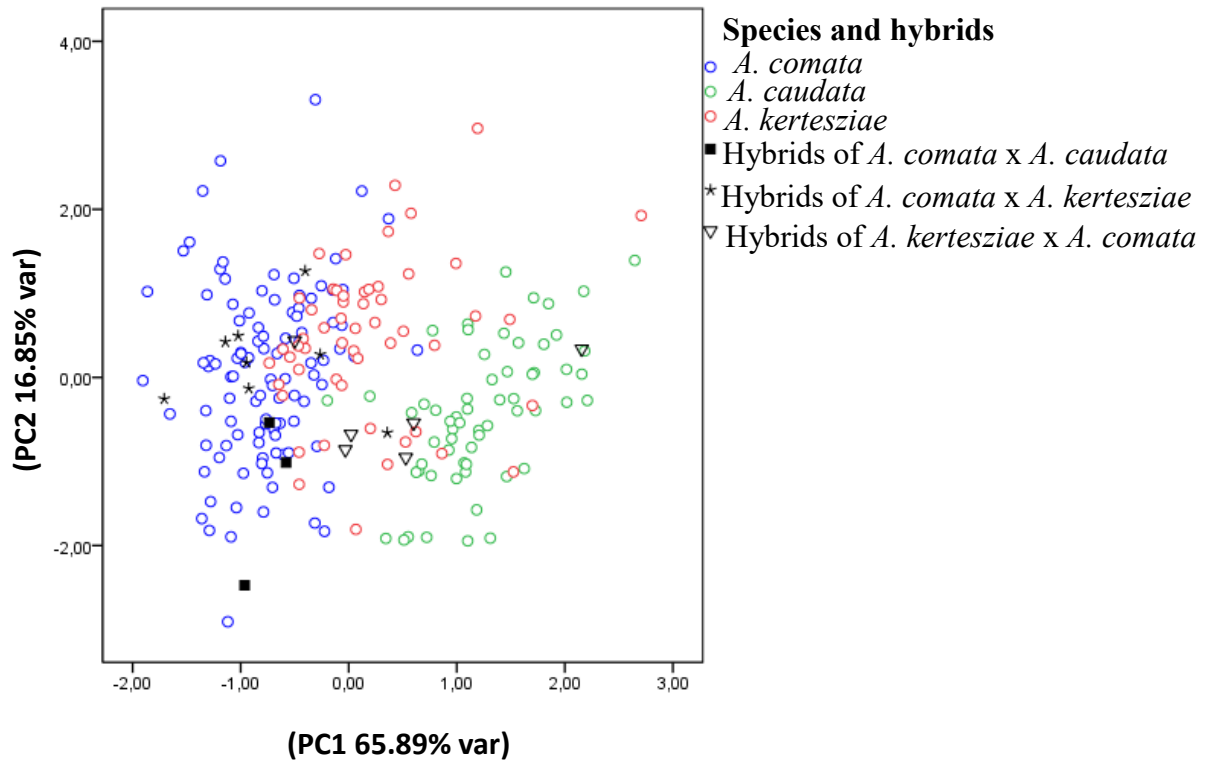


Figure 8. Scatterplot of scores derived from principal component analysis (PCA). PC1 vs. PC2 separated by species and hybrids (identified based on Structure results) based on four morphometric characters for *Aechmea comata*, *A. caudata*, *A. kertesziae*, and hybrids. Hybrids with similar morphology to one of the parental species are indicated by the first parental of the crossing. Var: variance.

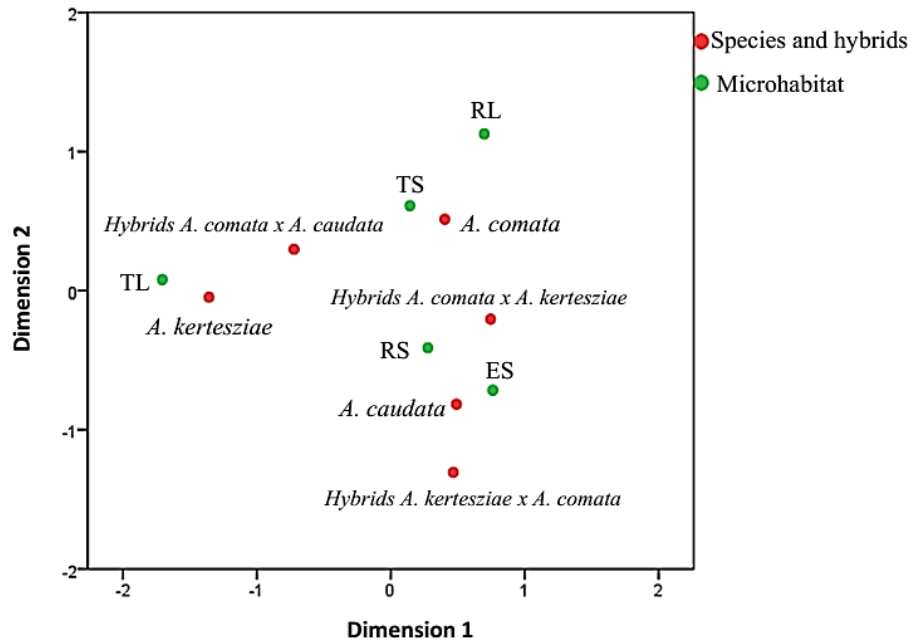


Figure 9. Correspondence analysis (CA) for three species of *Aechmea* (*A. comata*, *A. caudata*, and *A. kertesziae*) and hybrids (identified based on Structure results). Microhabitat preference was based on the habitat (T: terrestrial, R: rupicolous, E: epiphytic) and environment (high or low solar luminosity, L: Light and S: Shadow, respectively). Hybrids with similar morphology to one of the parental species are indicated by the first parental of the crossing.

Supplemental Information

Table S1. Details for all areas sampled in this study, including population names, species, sample sizes, geographical coordinates and voucher information.

Population	Species	Sample Size	Latitude (S)	Longitude (W)	Voucher
Allopatric					
Daniela-SC	<i>A. comata</i>	23	26°26'	48°31'	ICN 184897
Praia dos Ingleses - SC	<i>A. comata</i>	23	27°26'	48°22'	
Laguna-SC	<i>A. kertesziae</i>	25	28°30'	48°45'	ICN 167498
Caminho do Rei - SC	<i>A. caudata</i>	24	27°26'	48°24'	ICN 187561
Sympatric zones					
MLC-SC	<i>A. comata</i> – <i>A. kertesziae</i>	14	27°35'	48°28'	ICN 184898
UCAD-SC	<i>A. comata</i> – <i>A. kertesziae</i>	53	27°31'	48°30'	ICN 165256
PMLL-SC	<i>A. comata</i> – <i>A. caudata</i>	49	27°45'	48°29'	INC 186502/ICN 186503
Moçambique - SC	<i>A. comata</i> – <i>A. caudata</i>	33	27°28'	48°23'	ICN 187560
Total		244			

Notes: MLC: Morro da Lagoa da Conceição, UCAD: Unidade de Conservação Ambiental Desterro, PMLL: Parque Municipal Lagoinha do Leste, SC: Brazilian Federal state of Santa Catarina, ICN: Herbarium of Instituto de Ciências Naturais.

Table S2. Details for all populations used in morphological and ecological analyses, including names, species and sample sizes.

Population	Species	Sample Size analysis	
		Morphological	Ecological
Allopatric			
Daniela-SC	<i>A. comata</i>	31	31
Laguna-SC	<i>A. kertesziae</i>	35	35
Caminho do Rei-SC	<i>A. caudata</i>	31	33
Sympatric zones			
UCAD-SC	<i>A. comata</i> – <i>A. kertesziae</i>	56	57
PMLL-SC		50	50
Moçambique-SC	<i>A. comata</i> – <i>A. caudata</i>	33	33
Total		236	239

UCAD: Unidade de Conservação Ambiental Desterro, PMLL: Parque Municipal Lagoinha do Leste, SC: Brazilian Federal state of Santa Catarina.

Table S3. Morphological characters used in morphometric analyses separated by species and hybrids, including means and standard deviations. Hcc (hybrids between *A. comata* and *A. caudata* with similar morphology to *A. comata*), Hck (hybrids between *A. comata* and *A. kertesziae* with similar morphology to *A. comata*) and Hkc (hybrids between *A. kertesziae* and *A. comata* with similar morphology to *A. kertesziae*).

Morphological characters	Species and hybrids (Sample size)					
	<i>A. comata</i> (104)	<i>A. caudata</i> (61)	Hcc (3)	<i>A. kertesziae</i> (54)	Hck (8)	Hkc (6)
Total number of flowers	52.74 ± 22.80	142.10 ± 67.66	42.33 ± 12.01	92.83 ± 81.23	60.00 ± 37.80	126.50 ± 55.52
Height of rachis	6.83 ± 2.66	15.82 ± 4.92	4.83 ± 0.76	15.52 ± 5.69	5.88 ± 2.56	13.17 ± 5.05
Lower width of rachis	5.77 ± 1.33	8.23 ± 2.62	2.83 ± 0.76	4.39 ± 2.37	3.63 ± 0.52	4.83 ± 3.82
Width of lower floral bract	3.38 ± 1.80	2.97 ± 0.78	4.05 ± 1.18	4.94 ± 1.05	6.02 ± 0.97	3.90 ± 0.98

Table S4. Correlation among variables and each principal component. LN (Napierian logarithm).

Variables	Principal Components			
	PC1	PC2	PC3	PC4
LN_Total number of flowers	0.872	0.066	0.013	0.485
Height of the rachis	0.820	0.361	-0.395	-0.202
LN_Lower width of the rachis	0.854	0.159	0.445	-0.217
Width of floral bract	-0.682	0.717	0.099	0.105

Table S5. Morphological classification of the *A. comata*, *A. caudata* and *A. kertesziae*. Proportion of individuals classified correctly or incorrectly according to the morphology expected for each species. The first column lists the species based on field classification and the first row provides the predicted group membership.

Species (N)	Predicted Group Membership		
	<i>A. comata</i> (%)	<i>A. caudata</i> (%)	<i>A. kertesziae</i> (%)
<i>A. comata</i> (115)	112 (97.4)	1 (0.90)	2 (1.7)
<i>A. caudata</i> (61)	1 (1.6)	58 (95.1)	2 (3.3)
<i>A. kertesziae</i> (60)	16 (26.7)	5 (8.3)	39 (65.0)

Table S6. Morphological characters used in morphometric analyses of *A. comata*, *A. caudata*, *A. kertesziae* and hybrids separated by populations, including means and standard deviations. Hybrids with similar morphology to one of the parental species are indicated by the first parental of the crossing.

Species/populations (sample size)	Morphological characters			
	Total number of flowers	Height of rachis	Lower width of rachis	Width of lower floral bract
Allopatric				
<i>A. comata</i> - Daniela (31)	51.58 ± 20.40	6.68 ± 1.78	3.88 ± 3.10	6.32 ± 1.65
<i>A. caudata</i> – Caminho do Rei (31)	139.71 ± 54.11	14.42 ± 5.28	7.18 ± 1.52	2.66 ± 0.72
<i>A. kertesziae</i> – Laguna (35)	54.20 ± 15.84	16.20 ± 5.83	4.03 ± 0.48	5.42 ± 0.63
Sympatric zones				
PMLL				
<i>A. comata</i> (23)	54.96 ± 29.03	8.80 ± 3.61	3.65 ± 0.66	6.06 ± 0.76
<i>A. caudata</i> (26)	143.35 ± 81.06	17.54 ± 4.22	9.25 ± 3.20	3.40 ± 0.71
Hybrid (1)	43.00	5.00	3.50	5.07
Moçambique				
<i>A. comata</i> (27)	49.04 ± 18.51	6.09 ± 2.15	2.61 ± 0.40	4.61 ± 0.90
<i>A. caudata</i> (4)	152.50 ± 85.41	15.50 ± 3.24	9.75 ± 2.40	2.68 ± 0.36
Hybrids (2)	42.00 ± 16.97	4.75 ± 1.06	2.50 ± 0.71	3.55 ± 1.12
UCAD				
<i>A. comata</i> (23)	56.43 ± 24.10	5.93 ± 2.17	3.34 ± 0.53	6.13 ± 0.85
<i>A. kertesziae</i> (19)	164 ± 103.46	14.27 ± 5.36	5.06 ± 3.93	4.07 ± 1.12
Hybrids <i>A. comata</i> x <i>A. kertesziae</i> (8)	60.00 ± 37.80	5.88 ± 2.56	3.63 ± 0.52	6.02 ± 0.97
Hybrids <i>A. kertesziae</i> x <i>A. comata</i> (6)	126.50 ± 55.52	13.17 ± 5.05	4.83 ± 3.82	3.90 ± 0.98



Fig. S1. (A) *Aechmea comata*, (B) *A. caudata* and (C) *A. kertesziae*.



Fig. S2. Morphological variation of inflorescences in individuals of *A. comata* (A-F), *A. caudata* (G-J) and *A. kertesziae* (K-U). Individuals from UCAD sympatric area with intermediate morphology (N-P).



Fig. S3. Morphological characters measured in this study.

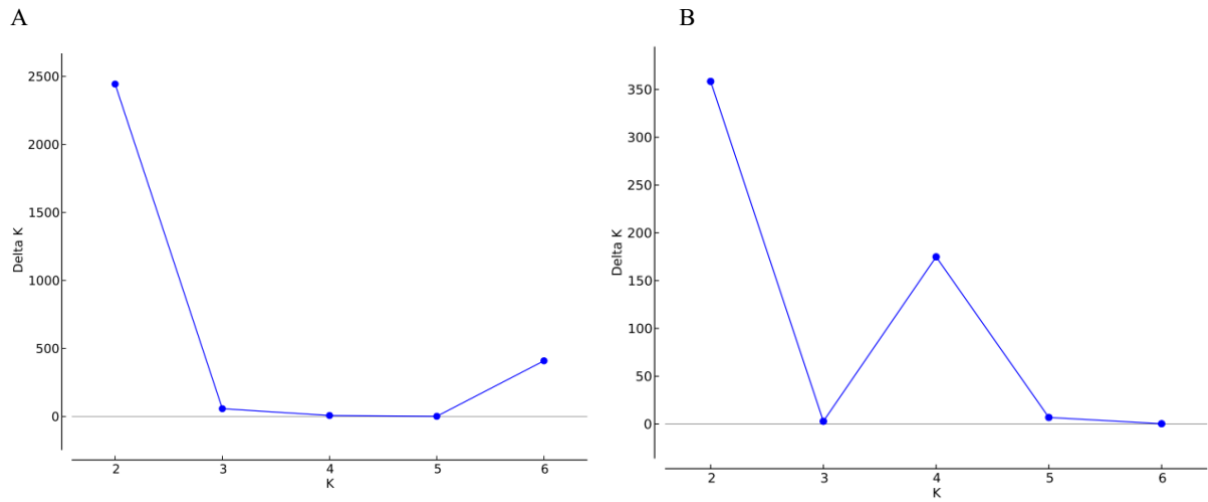


Fig. S4. Magnitude of ΔK from Structure analysis of K (mean \pm SD over 10 replicates), calculated by following the method proposed by Evanno *et al.* (2005), for *A. comata* and *A. caudata* (A), and for *A. comata* and *A. kertesziae* (B), based on nuclear microsatellite data. The model values of these distributions indicate the true K or the uppermost level of structure is two “genetic clusters”.



Fig. S5. A) *Aechmea comata*, B) *A. kertesziae*. Hybrids with similar morphology to *A. kertesziae* (C-G) and hybrids with similar morphology to *A. comata* (H-L).

Capítulo III

Considerações Finais



Aechmea kertesziae

Considerações Finais

A presente dissertação visa contribuir para a área de evolução de plantas Neotropicais e principalmente para uma melhor compreensão dos processos envolvidos na especiação de plantas, fluxo gênico interespecífico e barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas. *Aechmea comata*, *A. caudata* e *A. kertesziae*, as espécies abordadas nesse estudo, pertencem a um subgênero de recente diversificação em *Aechmea*: subgênero *Ortgiesia* (Silvestro *et al.*, 2014; Goetze *et al.*, 2016). A motivação para estudar essas espécies partiu de evidências que mostravam um possível processo de hibridação de *A. comata* com *A. caudata* e com *A. kertesziae*, baseadas em dados moleculares. Juntamente com dados da literatura e observações à campo, nosso grupo de pesquisa decidiu realizar um estudo envolvendo essas três espécies a fim de testar essa hipótese. Nesse estudo nós optamos por uma abordagem integrada de dados moleculares (marcadores de microssatélites nucleares e plastidiais), morfológicos, ecológicos (microhabitat) e cruzamentos artificiais, para fornecer uma perspectiva da natureza do limite das espécies.

Os resultados desse estudo comprovaram as suspeitas de hibridação de *A. comata* com *A. caudata* e com *A. kertesziae*, baseado nos dados moleculares e de compatibilidade reprodutiva dessas espécies pelos cruzamentos artificiais. Os dados plastidiais indicaram que o fluxo gênico interespecífico entre *A. comata* e *A. caudata* ocorreu via pólen em vez de sementes, e com *A. kertesziae* o fluxo gênico interespecífico ocorreu tanto via pólen como via sementes. Os dados ecológicos demonstraram que as três espécies e os híbridos apresentam diferentes preferências de microhabitat baseado no hábito e ambiente. Morfológicamente, *A. comata* e *A. kertesziae* apresentaram grande sobreposição de caracteres florais, enquanto que *A. comata* e *A. caudata* foram claramente distinguidas baseado nas variáveis analisadas nesse estudo.

Os híbridos entre esses dois pares de espécies não apresentaram morfologia intermediária quando comparado aos parentais. Estes resultados evidenciaram a dificuldade em reconhecer híbridos baseados apenas em caracteres morfológicos, especialmente em grupos que apresentam considerável variabilidade morfológica (Schulte *et al.*, 2010) e a inconsistência da morfologia para a identificação de híbridos baseados em caracteres sujeitos a influência ambiental (Leal *et al.*, 2016).

Os dados moleculares demonstraram que *A. comata* hibridiza em maior frequência com *A. kertesziae* (17 híbridos) do que com *A. caudata* (3 híbridos). Entre essas espécies, observou-se isolamento reprodutivo incompleto, tanto pré- (incompatibilidade do

estigma-pólen que afeta a formação do fruto) quanto pós-zigótico (mortalidade do embrião que afeta a viabilidade das sementes), mas o menor isolamento reprodutivo foi observado entre *A. comata* e *A. kertesziae*. Provavelmente isso se deve a relação filogenética mais próxima entre *A. comata* e *A. kertesziae* quando comparada com *A. caudata* (Goetze *et al.*, 2016).

Aechmea comata apresentou a maior diversidade genética já relatada para bromélias, apesar de ser uma espécie rara, restrita a Ilha de Santa Catarina. Os processos de hibridação com *A. caudata* e *A. kertesziae* poderiam representar um risco para *A. comata* devido ao fato de ser uma espécie rara e restrita. Nesse estudo não foi possível identificar o nível de introgressão entre essas espécies, o que permitiria estimar o risco que a hibridação pode representar para essas bromélias. Uma das possíveis consequências da hibridação com espécies raras é o enriquecimento do *pool* gênico através do fluxo gênico interespecífico que poderia ter acontecido com *A. comata* (Stebbins, 1942). Mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Os padrões de variação genética (nuclear e cpDNA), morfológica e ecológica (microhabitat) são coincidentes com a delimitação das espécies. Embora algum fluxo gênico tenha sido observado nas áreas simpátricas e *A. comata* tenha demonstrado compatibilidade reprodutiva com *A. caudata* e *A. kertesziae*, é provável que um conjunto de barreiras tanto pré- (isolamento fenológico e etológico, autocompatibilidade) quanto pós-zigóticas (baixa viabilidade e/ou esterilidade dos híbridos) sejam responsáveis pela manutenção da integridade dos limites das espécies. Mais estudos são necessários para confirmar as prováveis barreiras pós-zigóticas entre essas espécies e identificar a extensão da introgressão dentro de *A. comata*.

Referências Bibliográficas dos Capítulos I e III

Referências Bibliográficas

Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczemwski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfenning K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW and Zinner D (2013) Hybridization and speciation. *J Evol Biol* 26:229-246.

Abondanza BF (2012) Revisão taxonômica do complexo *Aechmea coelestis* (K. Koch) e *Morren* (Bromeliaceae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 82 pp.

Barrett CF and Freudenstein JV (2011) An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Mol Ecol* 20:2771–2786.

Benzing DH (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 690 p.

Canela MBF, Paz NPL and Wendt T (2003) Revision of the *Aechmea* multiflora complex (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 143:189-196.

Capra F (2012) Diversidade e estruturação genética em populações de *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica de Santa Catarina. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 45 p.

Coyne JA and Orr HA (2004) Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Crayn DM, Winter K and Smith JAC (2004) Multiple origins of Crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3703-3708.

de Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. In: *Endless forms: Species and speciation* (DJ Howard and SH Berlocher eds.). Oxford University Press, New York, pp 57-75.

de Queiroz K (1999) The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. In: Species: New interdisciplinary essays (R. A. Wilson, ed.). MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp 49-89.

de Queiroz K (2005a) Ernst Mayr and the modern concept of species. Proc Natl Acad Sci 102:6600–6607.

de Queiroz K (2005b) A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. Proc Calif Acad Sci 56:196–215.

de Queiroz K (2005c) Different species problems and their resolution. BioEssays 27:1263–1269.

de Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitations. Syst Biol 56:879–886.

Dorneles LL, Zillikens A, Harter-Marques B and Steiner J (2011) Effective pollinators among the diverse flower visitors of the Bromeliad *Aechmea lindenii* in south Brazilian Atlantic Rain Forests. Entomol Gener 33:149-164.

Duminil J, Caron H, Scotti I, Cazal SO and Petit RJ (2006) Blind population genetics survey of tropical rainforest trees. Mol Ecol 15:3505–3513.

Duminil J, Kenfack D, Viscosi V, Grumiau L, Hardy OL (2012) Testing species delimitation in sympatric species complexes: the case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). Mol Phylogenet Evol 62:275-285.

Duminil, J and Di Michele M (2009) Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. Plant Biosyst 143:528–542.

Edwards CE, Judd WS, Ionta GM and Herring B (2009) Using population genetic data as a tool to identify new species: *Conradina cygniflora* (Lamiaceae) a new endangered species from Florida. Syst Bot 34:747–759.

Evans TM, Jabaily RS, Faria APG, Sousa LOF, Wendt T and Brown GK (2015) Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on Plastid DNA sequence data. Syst Bot 40:116–128.

Faria APG, Wendt T and Brown GK (2004a) Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Ann Mo Bot Gard* 91:303-319.

Faria APG, Wendt T and Brown G (2004b) Insights on the phylogenetic relationships of *Aechmea* and related genera in Subfamily Bromelioideae. *J Bromeliad Soc* 54:145-192.

Faria APG, Wendt T and Brown GK (2010) A revision of *Aechmea* subgenus *Macrochordion* (Bromeliaceae) based on phenetic analyses of morphological variation. *Bot J Linn Soc* 162:1-27.

Forzza RC, Leitman PM, Costa A, Carvalho Jr AA, Peixoto AL, Walter BMT, Bicudo C, Zappi D, Costa DP, Lleras E, Martinelli G, Lima HC, Prado J, Stehmann JR, Baumgratz JFA, Pirani JR, Sylvestre LS, Maia LC, Lohmann LG, Paganucci L, Silveira M, Nadruz M, Mamed MCH, Bastos MN, Morim MP, Barbosa MR, Menezes M, Hopkins M, Secco R, Cavalcanti T and Souza VC (Eds.) Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1 vol., 871p.

Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE and Systma JK (2004) Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south american-african disjunctions in Rapataceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *Int J Plant Sci* 165:S35-S54.

Givnish TJ, Milliam KC, Berry PE and Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23:3-26.

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE and Sytsma K (2011) Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98:872-895.

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JA, Winter K, Brown G, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE and Systma, KJ (2014) Adaptive radiation, correlated and contingente

evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol Phylogenet Evol* 71:55–78.

Goetze M (2010) Filogeografia e diversidade genética de *Aechmea caudata* (Lindm.) e *A. winkleri* (Reitz) (Bromeliaceae): implicações taxonômicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 89 p.

Goetze M, K Schulte, C Palma-Silva, CM Zanella, MV Büttow, F. Capra and F. Bered. (2016) Diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae) in the Brazilian Atlantic rainforest: a case study in *Aechmea* subgenus *Ortgiesia*. *Mol Phylogenet Evol* 98:346–357.

Gouda EJ, Butcher D and Gouda CS (cont.updated) *Encyclopaedia of Bromeliads, Version 3*. <http://encyclopedia.florapix.nl/>. University Botanic Gardens, Utrecht (accessed: 03/10/2016).

Harrison RG and Larson EL (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *J Hered* 105:795–809.

Hausdorf B and Hennig C (2010) Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Syst Biol* 59:491–503.

Horres R, Schulte K, Weising K and Zizka G (2007) Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso* 23:27–43.

Jabaily RS and Sytsma KJ (2010) Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): placement, major lineages, and evolution of Chilean species. *Am J Bot* 97:337–356.

Jørgensen MH, Carlsen T, Skred I and Elven R (2008) Microsatellites resolve the taxonomy of the polyploid *Cardamine digitata* aggregate (Brassicaceae). *Taxon* 57:882–892.

Kamke R (2009) Polinização por abelhas em *Aechmea caudata* Lindm. uma bromélia com características ornitófilas, na ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 45 p.

Kamke R, Schmid S, Zillikens A, Lopes BC and Steiner J (2011) The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. *Flora* 206:749-756.

Knowles LL and Carstens BC (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Syst Biol* 56:887-895.

Leal BSS, Chaves CJN, Koehler S and Borba E (2016) When hybrids are not hybrids: a case study of a putative hybrid zone between *Cattleya coccinea* and *C. brevipedunculata* (Orchidaceae). *Bot J Linn Soc* 181:621-639.

Leaché AD, Koo MS, Spencer CL, Papenfuss TJ, Fisher RN and McGuire JA (2009) Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proc Natl Acad Sci* 106:12418–12423.

Lenzi M, Matos JZ and Orth AI (2006) Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var: *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Bot Bras* 20:487-500.

Luther HE (2012) An alphabetical list of bromeliad binomials. Thirteenth edition. Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad Society. International.

Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa A and Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59:209-258.

Minder AM and Widmer A (2008) A population genomic analysis of species boundaries: neutral processes, adaptive divergence and introgression between two hybridizing plant species. *Mol Ecol* 17:1552–1563.

Padial JM, Miralles A, de la Riva I and Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers Zool.* 7:16–30.

Pessoa EM, Alves M, Alves-Araújo A, Palma-Silva C and Pinheiro F (2012) Integrating different tools to disentangle species complexes: a case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon* 61:721-734.

Petit RJ and Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends Ecol Evol* 24:386–393.

Pettengill JB and Neel M (2011) A sequential approach using genetic and morphological analyses to test species status: The case of United States federally endangered *Agalinis acuta* (Orobanchaceae). *Am J Bot* 98:859-871.

Reitz R (1983) Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense*, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 808 p.

Ross KG, Gotzek D, Ascunce MS and Shoemaker DD (2010) Species delimitation: A case study in a problematic ant taxon. *Syst Biol* 59:162–184.

Sass C and Specht CD (2010) Phylogenetic estimation of the core bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Mol Phylogenet Evol* 55:559-571.

Schulte K and Zizka G (2008) Multi locus plastid phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) and the taxonomic utility of petal appendages and pollen characters. *Candollea* 63:209-225.

Schulte K, Horres R and Zizka G (2005) Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). *Senckenbergiana Biol* 85:113-125.

Schulte K, Barfuss MHJ and Zizka G (2009) Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Mol Phylogenet Evol* 51:327-339.

Schulte K, Silvestro D, Kiehlmann E, Vesely S, Novoa P and Zizka G (2010) Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. *Mol Phylogenet Evol* 57:1105–1119.

Shaffer HB and Thompson RC (2007) Delimiting species in recent radiations *Syst Biol* 56:896-906.

Silvestro D, Zizka G and Schulte K (2014) Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution* 68:163-175.

Smith LB and Downs RJ (1974) *Flora Neotropica: monograph 14, part 1 – Pitcairnioideae*. The New York Botanical Garden, Hafner Press, New York, 658 p.

Smith LB and Downs RJ (1977) *Flora Neotropica: monograph 14, part 2 – Tillandsioideae*. The new York Botanical Garden, Hafner Press, New York, pp 659-1492.

Smith LB and Downs RJ (1979) *Flora Neotropica: monograph 14, Part 3 – Bromelioideae (Bromeliaceae)*. The New York Botanical Garden, Hafner Press, New York, pp 1493-2142.

Soltis SP and Soltis ED (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annu Rev Plant Biol* 60:561-88.

Stebbins GL (1942) The genetic approach to problems of rare endemic species. *Modroño* 6:241–272.

Terry RG, Brown GK and Olmstead RG (1997) Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *Am J Bot* 84:664–632.

Voltolini CH (2009) Anatomia de folhas e raízes de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 96 p.

Wanderley MGL and Martins SE (2007) Bromeliaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TS and Giulietti AM (coords) *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, pp 39-161.

Weisrock DW, Rasoloarison RM, Fiorentino I, Ralison JM, Goodman SM, Kappeler PM and Yoder A (2010) Delimiting species without nuclear monophyly in Madagascar's mouse lemurs. *PLoS One* 5:e9883.

Wiens JJ (2007) Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst Biol* 56:875-878.

Wiens JJ and Servedio MR (2000) Species delimitation in systematics: Inferring diagnostic differences between species. *Proc R Soc Lond* 267:631-636.

Wu CI (2001) The genic view of the process of speciation. *J Evol Biol* 14:851–865.