

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Padrões históricos e processo de hibridação entre duas
espécies simpátricas de bromélias da Mata Atlântica:
implicações evolutivas e conservacionistas**

Camila Martini Zanella

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Fernanda Bered

Co-orientadora: Dr^ª Clarisse Palma da Silva

Porto Alegre, junho de 2013.

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, no Laboratório de Genética Vegetal, Departamento de Genética da UFRGS, Porto Alegre, Brasil e no Laboratório de Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil. O projeto foi subvencionado pelo Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Edital Universal número 471775/2010-0 e 479413/2011-8), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PRONEX - FAPERGS Proc. 10/0198-0) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Proc 2009/52725-3).

A doutoranda obteve bolsa de estudos do CNPQ (48 meses).

Dedico esta tese a minha família, que sempre me deu muito apoio e todo o suporte afetivo e emocional, em especial a minha mãe Zamar; as minhas irmãs Mariane e Bruna. Também dedico esta tese ao meu grande amor Rafael, que esteve ao meu lado durante esses quatro anos de muito trabalho, sempre compreensivo e amoroso.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Bered, obrigada pela orientação, pelo exemplo, estímulo, amizade e confiança durante todo esse período de convivência.

À minha co-orientadora, Dr^ª Clarisse Palma da Silva, pelos auxílios com problemas de bancada e análises, pelo companheirismo e acolhimento em São Paulo, e por ter contribuído de forma significativa na minha formação.

À minha mãe e minhas irmãs, pelo apoio e confiança dados ao longo dessa jornada, de quem eu sei que sempre receberei muito amor e segurança.

Ao meu amor, Rafael Villas Boas Moreira, pelo incentivo, companheirismo, paciência e dedicação, tornando os meus dias sempre mais felizes.

À Márcia Goetze, pela amizade e cumplicidade nesta longa jornada de trabalho, pela convivência e apoio nas mais inusitadas situações.

À Prof^ª. Dr^ª Andrea Ferreira da Costa, pelo auxílio e colaboração com as coletas no Rio de Janeiro.

Ao Fábio Pinheiro, pelo auxílio com análises, campo e muitas discussões proveitosas.

Aos colegas do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, Miriam Valli Bütow, Márcia Goetze, Felipe Grillo Pinheiro, Fernanda Capra, Aline Janke, pela convivência e auxílio nos campos e laboratório.

A todos os colegas do laboratório de Genética Vegetal, em especial a Carolina Werner Ribeiro, Ricardo Weber, Samanta Bolsan de Campo, Rafael Arenhart e Lauro Bucker Neto, pela convivência, cafés, chocolates e muitas risadas, que tornaram esses quatro anos de trabalho mais leves.

Ao Prof. Jorge Ernesto de Araujo Mariath e aos seus alunos, por me proporcionarem participar do “Monocots Expedition”, com muitos momentos divertidos e viagens intermináveis e é claro ao PRONEX, que nos proporcionou tudo isso.

A todos os meus amigos, por tornarem a minha vida muito mais divertida com as nossas jantas, festas e conversas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o doutorado e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta tese.

Aos professores do PPGBM pelas aulas e conhecimentos transmitidos.

Às professoras Maria Helena Bodaneze Zanettini, Márcia Margis, Luciane Passaglia e Eliane Kaltchuk dos Santos, pelo apoio científico, convivência e contribuições para o bom funcionamento do laboratório.

Ao secretário do PPGBM Elmo J. Antunes Cardoso, pelo suporte burocrático e apoio para solucionar problemas.

Aos chefes das unidades de conservação, guarda-parque e órgãos estaduais e federais pelo auxílio na aquisição de licenças de coletas e acesso as unidades de conservação.

Aos professores, colegas de profissão, guias de turismo e demais pessoas que de alguma forma auxiliaram nas coletas a campo, sem a ajuda e disponibilidade de vocês este trabalho não sairia do papel.

Ao CNPq, FAPERGS e FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos, que de alguma forma contribuíram e conviveram comigo, meus sinceros agradecimentos pela contribuição, convivência e carinho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I: Introdução Geral.....	13
1. Família Bromeliaceae	14
2. Gênero <i>Vriesea</i>	16
3. Diversidade genética.....	18
4. Filogeografia e padrões históricos do bioma Mata Atlântica	19
5. Hibridação.....	23
6. Objetivos.....	25
CAPÍTULO II: Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae	26
CAPÍTULO III: Phylogeography of two sympatric species, <i>Vriesea carinata</i> and <i>V. incurvata</i> (Bromeliaceae), as a contribution to unravel the evolutionary history of the southern portion of Brazilian Atlantic Forest.....	34
CAPÍTULO IV: Natural hybridization between two sympatric species of bromeliads from Brazilian Atlantic Forest: evolutionary implications for species cohesion	72
CAPÍTULO V: Considerações Finais	104
CAPÍTULO VI: Referências Bibliográficas.....	109

RESUMO

A família Bromeliaceae é uma das famílias de plantas com flores mais diversas morfológica e ecologicamente nativas do Novo Mundo, e é bem conhecida por ter sofrido radiação adaptativa recente, evoluindo para habitar inúmeros nichos e ocupando os mais diversos tipos de ambientes. Bromeliaceae surgiu no Escudo das Guianas cerca de 100 milhões de anos atrás (Ma), e linhagens modernas começaram a divergir cerca de 19 Ma, chegando na América tropical e subtropical há 15,4 Ma, aproximadamente. Devido a sua história evolutiva recente, limites genéricos frequentemente sofrem alterações na família Bromeliaceae, com espécies incipientes não completamente definidas. A Floresta Atlântica Brasileira (BAF) é um dos centros de diversidade das bromélias, sendo também um dos centros de diversidade do gênero *Vriesea*. *Vriesea carinata* e *V. incurvata* podem ser consideradas modelos interessantes para o estudo dos padrões históricos da BAF e também para o estudo dos processos de coesão de espécies e barreiras reprodutivas, por serem espécies endêmicas da BAF, com ampla distribuição ao longo dessa ecorregião, sendo encontradas em simpatria e compartilham polinizadores. Assim, este trabalho foi dividido em três manuscritos, buscando uma melhor compreensão da história evolutiva da família Bromeliaceae, bem como da Floresta Atlântica Brasileira. No **Capítulo II**, é apresentado um artigo de revisão, compilando os estudos sobre a família Bromeliaceae, no qual foram abordados aspectos como: diversidade genética, adaptações evolutivas, sistemas de cruzamento e suas consequências sobre a estruturação populacional e conservação *in situ*. Os dados do artigo de revisão demonstraram que Bromeliaceae tem três centros de diversidade, 58 gêneros e cerca de 3.170 espécies. As bromélias são preferencialmente polinizadas por vertebrados e apresentam uma marcante variação nos sistemas de cruzamento, de endogamia predominante à polinização cruzada obrigatória, e uma constância no número de cromossomos ($x = 25$). Bromélias com sistema de cruzamento autógamo ou misto têm um alto coeficiente de endogamia (F_{IS}), enquanto que as espécies de fecundação cruzada apresentam F_{IS} baixos. O grau de diferenciação entre as populações (F_{ST}) variou de 0,043 a 0,961, e pode ser influenciado pela dispersão do pólen e sementes, crescimento clonal, taxas de fluxo gênico e conectividade entre as populações. Bromeliaceae apresenta algumas adaptações morfológicas e fisiológicas, incluindo o metabolismo ácido das crassuláceas de fotossíntese (CAM), formação de rosetas que

acumulam água, tricomas absortivos nas folhas e hábito epífita, que podem ter sido cruciais para a radiação adaptativa desta família. Além disso, muitas espécies são endêmicas com distribuição restrita e/ou são encontradas em ecorregiões ameaçadas de extinção, como a BAF. A preservação deste tipo de ecorregião é vital para a conservação da família Bromeliaceae e das espécies associadas.

No **Capítulo III**, nós estudamos os padrões filogeográficos de *Vriesea carinata* e *V. incurvata* com o objetivo de fornecer informações sobre os processos históricos que influenciaram na diversificação da BAF. Nós testamos a hipótese de que *V. carinata* e *V. incurvata* apresentariam o mesmo padrão filogeográfico, uma vez que podem ter sido submetidas às mesmas alterações climáticas no passado, pois apresentam distribuição geográfica semelhante. Foram amostradas 16 populações de *V. carinata* e 11 de *V. incurvata*, as quais utilizamos para descrever os padrões de variações genéticas do DNA plastidial (cpDNA) e nuclear (microssatélites). *Vriesea carinata* e *V. incurvata* apresentaram padrões filogeográficos semelhantes, com uma forte descontinuidade genética norte/sul entre as populações, sem compartilhamento haplotípico entre essas regiões. A presença de dois grupos genéticos distintos suporta a hipótese de que *V. carinata* e *V. incurvata* sobreviveram em mais de um refúgio durante as oscilações climáticas do Pleistoceno. Um putativo refúgio seria na porção litorânea sul-sudeste (latitude 25°S - PR/SP) e outro no sudeste do Brasil (latitude 20°S - RJ/ES). Os resultados são consistentes com registros encontrados na literatura para a BAF. No entanto, mais estudos são necessários para entender a complexa história da BAF, uma vez que este padrão foi provavelmente moldado ao longo do Pleistoceno, mas eventos anteriores, como soerguimento da costa leste brasileira durante o Terciário, também podem ter influenciado a distribuição e a diversificação dos taxa.

No **Capítulo IV**, nós investigamos a ocorrência de hibridação natural entre *V. carinata* e *V. incurvata* em quatro populações onde elas são encontradas em simpatria. Estas espécies são bem delimitadas taxonomicamente, apresentam morfologia floral similar e compartilham polinizador (beija-flor), apresentando floração sequencial com um curto período de sobreposição do florescimento. O grau de isolamento reprodutivo entre espécies relacionadas é um fator importante que influencia a integridade genética das espécies e a formação de híbridos. Foram amostradas e analisadas quatro populações simpátricas, utilizando duas regiões plastidiais e 14 locos de microssatélites, e híbridos

foram encontrados em todas elas, com um total de 19 indivíduos, indicando que ocorre fluxo gênico interespecífico entre *V. carinata* e *V. incurvata*. Análises Bayesianas identificaram híbridos F2 e retrocruzamentos com *V. incurvata* e a rede de haplótipos do cpDNA identificou introgressão bidirecional entre estas duas espécies. Nas populações simpátricas com distribuição mais ao norte foi encontrado um maior número de híbridos, provavelmente por causa de um gradiente latitudinal, que pode influenciar nas estações do ano, temperatura, precipitação e também o período de floração das espécies. A taxa de fluxo gênico interespecífico ($Nem < 0,5$) foi considerada alta, contribuindo para a formação de 10% de híbridos nas populações estudadas, porém a ausência de híbridos F1 indica que a barreira reprodutiva está sendo eficaz. A diferença temporal de floração das duas espécies tem atuado como uma barreira reprodutiva prezigótica forte, sendo a principal força responsável pela coesão das espécies. O conhecimento da hibridação e dos padrões de fluxo gênico interespecífico é importante para a compreensão dos processos de especiação, do movimento de genes entre espécies relacionadas e da manutenção da coesão das espécies. Em suma, os resultados obtidos no presente estudo, utilizando *V. carinata* e *V. incurvata* como modelos, permitiram aumentar a compreensão dos padrões históricos da BAF, dos processos biológicos e ecológicos envolvidos na evolução do isolamento reprodutivo responsável pela manutenção da coesão das espécies de plantas.

ABSTRACT

Bromeliaceae family is one of the morphologically and ecologically most diverse flowering plant families native to the New World and is well known for its recent adaptive radiation, evolving to live in numerous niches and occupying the most diverse types of environments. Bromeliaceae arose in the Guayana Shield roughly 100 million years ago (Ma), and modern lineages began to diverge from each other roughly 19 Ma, arriving in tropical and subtropical America from near 15.4 Ma. Due to its recent evolutionary history, generic boundaries often suffer changes in the Bromeliaceae family, with incipient species not completely defined. Brazilian Atlantic Forest (BAF) is one of the centers of bromeliads diversity, being also one of the diversity centers of *Vriesea* genus. *Vriesea carinata* and *V. incurvata* may be interesting models for the study of BAF historical patterns and also for studying species cohesion processes and reproductive barriers, to be endemic species of BAF, with wide distribution throughout this ecoregion, being found in sympatry and share pollinators. Thus, this thesis was divided in three manuscripts, which seeking a better understanding of the evolutionary history of the Bromeliaceae family, as well as BAF ecoregion. In the **Chapter II**, a review manuscript were presented, compiling the studies on Bromeliaceae family using approaches as: genetic diversity, evolutionary adaptations, mating systems and their consequences on the population structure and *in situ* conservation. The review's results revealed that Bromeliaceae has three diversity centers, 58 genera, and about 3,170 species. Bromeliads are preferentially pollinated by vertebrates and show marked variation in breeding systems, from predominant inbreeding to obligatory outcrossing, as well as constancy in chromosome number ($x = 25$). Autogamous or mixed mating system bromeliads have a high inbreeding coefficient (F_{IS}), while outcrossing species show low F_{IS} . The degree of differentiation among populations (F_{ST}) of species ranges from 0.043 to 0.961, and can be influenced by pollen and seed dispersal effects, clonal growth, gene flow rates, and connectivity among populations. Bromeliaceae showed some morphological and physiological adaptations, including crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis, formation of rosettes that accumulate water, leaf absorptive scales and epiphytic habit, which might have been crucial to the adaptive radiation of this family. Also, many species are endemic with restricted distribution and/or are found in endangered ecoregion, as BAF. The preservation of this type of ecoregion is

vital for the conservation of Bromeliaceae and associated species.

In the **Chapter III**, we studied the phylogeographic patterns of *Vriesea carinata* and *V. incurvata* aiming to provide insights into the historical processes that underlined diversification in BAF. We evaluated the hypothesis that *V. carinata* and *V. incurvata* would present the same phylogeographic pattern, since they could be subjected to the same climatic changes in the past because they present similar geographic distribution. We sampled 16 populations of *V. carinata* and 11 of *V. incurvata*, which we use to describe the patterns of genetic variation in plastid (cpDNA) and nuclear DNA (microsatellites). *Vriesea carinata* and *V. incurvata* showed similar phylogeographic patterns, with strong genetic discontinuity among north/south populations and without haplotypic sharing among these regions. The presence of two genetic distinct groups would seem to support the hypothesis that *V. carinata* and *V. incurvata* survived in more than one fragmented refugia during Pleistocene climatic oscillations. One putative refugium was on coastal south-southeastern (latitude 25°S - PR/SP) and another in southeastern Brazil (latitude 20°S - RJ/ES). The results are consistent with records encountered in the literature for the BAF. However, more studies are required for understanding the BAF complex history, since this pattern was probably shaped throughout the Pleistocene, but earlier events, as uplift of Brazilian east coast during Tertiary, may be also influenced the distribution and diversification of taxa.

In the **Chapter IV**, we investigated natural hybridization between *V. carinata* and *V. incurvata* in four populations where they are found in sympatry. These species are well defined taxonomically, show similar floral morphology and share pollinator (hummingbird), presenting sequential flowering and short time of blooming overlap. The degree of reproductive isolation among related species is an important factor influencing species genetic integrity and hybrids formation. We sampled and analyzed four sympatric populations, using two plastid regions and 14 microsatellite loci, and hybrids were found in all of them, with a total of 19 individuals, indicating that interspecific gene flow occurs between *V. carinata* and *V. incurvata*. Bayesian assignment analysis identified F2 hybrids and backcrosses towards *V. incurvata* and cpDNA haplotypic network identified bidirectional introgression between these two species. In sympatric populations with lower latitude we found a greater number of hybrids, probably because of a latitudinal gradient, which may influence the seasons of the year, temperature, precipitation, and also in

flowering period of the species. The rate of interspecific gene flow ($N_e m < 0.5$) was considered high, contributing to the formation of 10% hybrids in the studied populations, however the absence of F1 hybrids indicates the reproductive barrier being effective. The temporal difference in the flowering period of the two species has acted as a strong prezygotic reproductive barrier, being the main force responsible for species cohesion. The knowledge of hybridization and patterns of interspecific gene flow are important for understanding the process of speciation, the movement of genes across species boundaries and the maintaining of species cohesion. Finally, the results obtained in this study, using *V. carinata* and *V. incurvata* as a models, allow us to increase the understanding of BAF historical patterns, and of biological and ecological processes involved in the development of reproductive isolation responsible for maintaining the cohesion of plant.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

1. Família Bromeliaceae

Bromeliaceae Juss é uma família de angiosperma típica de regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, apresentando uma ampla diversidade morfológica e ecológica (Benzing, 2000). Sua distribuição geográfica é ampla, sendo encontrada, desde os estados da Virgínia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos (latitude 37° N) até o norte da Patagônia, na Argentina (latitude 44° S). A única exceção é *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr., localizada no Oeste da África, na região da Guiné (Porembsky e Barthlott, 1999); sua ocorrência no continente africano é atribuída a um evento recente de dispersão a longa distância (Givnish *et al.*, 2004). Bromeliaceae sofreu um processo de radiação adaptativa recente, sendo que suas espécies são encontradas nos mais variados nichos, com uma grande variação de formas, cores e tamanhos (Benzing, 2000). As plantas podem ocorrer desde o nível do mar até os elevados altiplanos da cordilheira dos Andes (4.000m), em locais úmidos como a Mata Atlântica, ou regiões áridas como a Caatinga, bem como em solos sujeitos a inundações regulares (espécies reófitas) e em locais de baixa ou alta luminosidade (Benzing, 2000). Podem ser terrestres, terrestres ocasionais, rupículas, saxícolas ou epífitas, mas nunca parasitas. Nas espécies epífitas as raízes têm apenas função de fixação, enquanto nas terrestres atuam na fixação e na absorção de água (Coffani-Nunes, 2002).

Paleo-registros oriundos de macro e microfósseis (pólen) indicam a existência de representantes de Bromeliaceae a partir do médio Terciário (Benzing, 2000). Segundo Givnish *et al.* (2011) as bromélias surgiram no Escudo das Guianas há cerca de 100 milhões de anos (Ma) durante o Período Cretáceo, sendo que as subfamílias existentes atualmente começaram a divergir há apenas cerca de 19 Ma. Estes autores também sugeriram que há cerca de 15,4 Ma as bromélias chegaram a regiões da América tropical e subtropical e provavelmente chegaram na região da África tropical há 9,3 Ma (*Pitcairnia feliciana*).

A ampla diversidade de habitats, nos quais as bromélias são encontradas, se deve a algumas adaptações morfológicas e ecológicas adquiridas por essa família ao longo de sua

história evolutiva. Uma importante característica é a formação de um “tanque” que possibilita o armazenamento da água da chuva, esse tanque é formado pela disposição das folhas, de forma helicoidal, formando uma roseta central. A transição de forma de vida terrestre para epífita auxiliou na conquista de novos nichos e territórios, e parece estar associada ao surgimento de tricomas absorptivos nas folhas, os quais são responsáveis pela absorção de água e nutrientes presentes no tanque, uma adaptação importante, tendo em vista que espécies epífitas apresentam raízes rudimentares, com função apenas de fixação (Benzing, 2000; Crayn *et al.*, 2004). Outra modificação fisiológica que auxiliou no sucesso adaptativo das bromélias foi o surgimento do sistema CAM de fotossíntese (metabolismo ácido das crassuláceas). Todos esses mecanismos auxiliam na resistência à seca, tanto na absorção quanto na conservação de nutrientes em ambientes xéricos e rochosos (Pittendrigh, 1948; McWilliams, 1974; Crayn *et al.*, 2004; Givnish *et al.*, 2007; Schulte *et al.*, 2009).

Smith e Downs (1975; 1977; 1979) publicaram uma Monografia da Flora Neotropica da família Bromeliaceae (“*Flora Neotropical Monograph – Bromeliaceae*”), na qual compilaram todas as espécies descritas da família até as referidas datas de publicação, totalizando três volumes, um para cada subfamília: Bromelioideae, Pitcarnioideae e Tillandsioideae. A família era tradicionalmente dividida nestas três subfamílias, porém, um estudo recente baseado em oito regiões plastidiais demonstrou que Pitcarnioideae é parafilética, separando-a em seis subfamílias e propondo o seguinte relacionamento entre elas: (Brocchinioideae, (Lindmanioideae, (Tillandsioideae, (Hechtioideae, (Navioideae, (Pitcarnioideae, (Puyoideae, Bromelioideae)))))); Givnish *et al.*, 2007, 2011). Atualmente são conhecidas cerca de 3170 espécies de bromélias, distribuídas em 58 gêneros (Luther, 2008), sendo que três centros de diversidade são considerados para Bromeliaceae: no norte dos Andes até o México e as Antilhas, no Planalto das Guianas e no leste do Brasil (Smith e Downs, 1974). No Brasil podemos encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas, representando um contingente significativo de espécies, tornando o país um importante centro de diversidade desse grupo (Leme e Marigo, 1993).

A família Bromeliaceae também apresenta importância econômica, com espécies sendo utilizadas pelos povos nativos das Américas, estando fortemente presentes em suas culturas. Atualmente, mais de 90 espécies são utilizadas para diversos fins: fibras, forragem, alimentação humana, rituais místicos, combustíveis, ornamentação, medicinais,

cosméticos entre outros (Reitz, 1983; Bennet *et al.*, 2001; Zanella *et al.*, 2011). Entretanto, o interesse pelo cultivo de bromélias ornamentais para a comercialização é muito recente, datando do início dos anos 1990 (Coffani-Nunes, 2002). A crescente demanda de mercado tem sido responsável pelo aumento na produção e comercialização de bromélias. No entanto, um considerável aumento no extrativismo ilegal, especialmente de espécies com ciclos de vida longos, vem reduzindo muitas populações de espécies oriundas, principalmente, da Mata Atlântica (Coffani-Nunes, 2002). Além disso, a coleta predatória e a perda de habitat devido à ação antrópica vêm contribuindo para o aumento do número de plantas vulneráveis, ameaçadas de extinção ou mesmo em extinção (Bered *et al.* 2008). A espécie com maior importância econômica atualmente é o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.), ocupando a quarta posição entre as frutas tropicais para a produção comercial, atrás da melancia, banana e manga (Chwee e Ahmad, 2008). Ecologicamente, as bromélias também desempenham um papel importante, sendo fonte de frutos carnosos, néctar, água (acumulada nos tanques formados pelas folhas) e abrigo para animais associados (mamíferos, anfíbios, pássaros e insetos; Benzing, 2000). Apesar de um crescente aumento de estudos com espécies desta família e de sua importância ecológica e econômica, a bibliografia científica ainda é consideravelmente restrita (Zanella *et al.*, 2012a).

2. Gênero *Vriesea*

O gênero *Vriesea* Lindl. é o segundo maior na subfamília Tillandsioideae e o terceiro maior na família Bromeliaceae (Benzing, 2000), sendo composto por 258 espécies (Luther, 2008) e dividido em duas seções, *Vriesea* e *Xiphion*. O gênero tem dois centros de diversidade, um deles fica no leste do Brasil, onde ocorrem cerca de 84% das espécies, e o outro ocorre mais ao norte, na América do Sul, América Central e Caribe (Costa *et al.*, 2009). As espécies desse gênero ocorrem preferencialmente em ambientes mesófilos, mas também ocorrem em campos rupestres, campos de altitude e costões rochosos (“inselbergs”). Muitos casos de endemismo são conhecidos no gênero *Vriesea*, mas espécies de ampla distribuição também são reportadas (Smith e Downs, 1977). Como o gênero *Vriesea* é típico de ambientes úmidos, em estudos florísticos na Mata Atlântica avaliando espécies da família Bromeliaceae, o gênero *Vriesea* apresenta alta riqueza de

número de espécies (Martinelli, 1994; Wanderley e Mollo, 1992; Machado e Semir, 2006; Costa e Wendt, 2007).

Vriesea carinata Wawra e *Vriesea incurvata* Gaudichaud, objetos de estudo do presente trabalho, são espécies típicas da Mata Atlântica, bem estabelecidas taxonomicamente, com hábito preferencialmente epifítico, mas também podendo ser terrestres e rupícolas, e ocorrem em lugares úmidos e bem preservados. *Vriesea carinata* é uma espécie com ampla distribuição, ocorrendo desde o norte do Rio Grande do Sul até o sul da Bahia, apresenta roseta infundibuliforme, suas folhas possuem bainha esverdeada podendo apresentar mancha vinosa de tamanho e posição variável (Wanderley e Martins, 2007). A inflorescência é simples, com 4 a 12 flores; brácteas florais com base vermelha e ápice amarelo. Flores dísticas, sépalas amarelas e pétalas amarelas com o ápice verde (Smith e Downs, 1977). É uma espécie diploide com $2n = 50$, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e alta viabilidade de pólen (94,3%; Palma-Silva *et al.*, 2004). Seu florescimento ocorre no inverno, de abril a outubro, com pico entre os meses de junho e agosto, as flores normalmente abrem às 07h30min e fecham às 17h, com duração de apenas um dia (Araujo *et al.*, 2004; Machado e Semir, 2006).

Vriesea incurvata apresenta uma distribuição um pouco mais restrita, sendo encontrada desde o norte do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro, podendo apresentar uma altura de até 70 cm, com roseta infundibuliforme e folha com bainha verde. A inflorescência é simples, em racemo, com 10 a 35 flores eretas e oblongas; as brácteas florais são vermelhas, às vezes com margem amarelada. As flores são dísticas, com sépalas e pétalas amarelas (Smith e Downs, 1977). Segundo Palma-Silva *et al.* (2004), *V. incurvata* é diploide, com $2n = 50$, com alta viabilidade de pólen (90,0%). As flores de *V. incurvata* tem duração de apenas um dia, abrindo às 06h30min e fechando às 19h, florescendo no verão entre os meses de outubro a maio, com pico de florescimento entre janeiro e março (Machado e Semir, 2006).

Vriesea carinata e *V. incurvata* apresentam morfologia floral semelhante e síndrome de polinização ornitófila, sendo polinizadas por beija-flores (*Phaethornis eurynome* Lesson e *Melanotrochilus fuscus* Vieillot; Machado e Semir, 2006). Estas espécies podem ser encontradas em simpatria e possuem florescimento sequencial, *V. carinata* no inverno e *V. incurvata* no verão, porém uma pequena sobreposição já foi observada entre elas (Araujo *et al.*, 2004). A floração sequencial das bromeliáceas em uma região pode ser de extrema

importância para a manutenção dos agentes polinizadores na área, contribuindo para a eficiência no sistema de polinização de espécies ornitófilas da comunidade (Waser e Real, 1979, Feinsinger, 1983, Araujo *et al.*, 1994, Fischer e Araujo, 1995). Porém, em espécies simpátricas com polinizadores generalistas, pode ocorrer transferência interespecífica de pólen (Hersch e Roy, 2007).

3. Diversidade genética

Caracterizar os níveis de diversidade genética dentro das populações naturais é de importância primária e está diretamente relacionada com aspectos da história de vida da espécie, podendo fornecer informações importantes com implicações na biologia evolutiva, ecologia e biologia da conservação. A estrutura genética das populações reflete a interação entre diferentes processos, incluindo a sua história evolutiva (distribuição, fragmentação de habitat, isolamento da população), mutações, deriva genética, sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção (Sales *et al.*, 2001), as quais podem ajudar a compreender processos de adaptação a circunstâncias ecológicas particulares (Parker *et al.*, 1998).

O advento dos marcadores moleculares de DNA, principalmente aqueles baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), oportunizou a caracterização genética de diferentes espécies em fina escala e sem a influência do ambiente (Reif *et al.*, 2004). Além disso, análises utilizando marcadores moleculares fornecem informações sobre alguns fatores que determinam a estrutura genética populacional, tais como estimativas de padrões de dispersão do pólen, distância de dispersão e fluxo gênico, que são particularmente importantes para a otimização de programas de conservação *in situ* (Dawson *et al.*, 1997; Oubourg *et al.*, 1999; He e Smouse, 2002; He *et al.*, 2004).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites ou SSR (“*simple sequence repeats*”) são marcadores codominantes, normalmente isolados de regiões não codificantes e espécie-específicos. Deste modo, estes marcadores podem ser utilizados para ajudar a resolver problemas que variam desde a taxonomia, questões relacionadas à paternidade, à estrutura genética de populações, padrões de hibridação, sistema de cruzamento, especialização ecológica e capacidade de colonização de populações (McDonald e Potts, 1997; Parker *et al.*, 1998; Boneh *et al.*, 2003).

Como os locos de microssatélites são espécie-específicos, é necessário isolá-los para cada espécie. Porém a presença de regiões flanqueadoras conservadas permite a amplificação desses locos em espécies próximas. No caso da família Bromeliaceae, a qual sofreu radiação adaptativa recentemente, apresentando baixos níveis de divergência nas sequências de DNA (Maia *et al.*, 2012), os marcadores são transferíveis entre espécies da mesma subfamília e até entre as subfamílias (Barbará *et al.*, 2007, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008; Wohrmann e Weising, 2011; Wohrmann *et al.*, 2012a; 2012b; Zanella *et al.*, 2012b, Goetze *et al.*, 2013).

Os trabalhos publicados sobre a diversidade genética de populações de espécies da família Bromeliaceae ainda são escassos, dos 58 gêneros e aproximadamente 3170 espécies conhecidas, apenas 20 delas, de dez gêneros, foram estudadas: *Aechmea*, *Alcantarea*, *Ananas*, *Bromelia*, *Dyckia*, *Encholirium*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia* e *Vriesea* (Zanella *et al.*, 2012a). Marcadores codominantes foram os mais utilizados, com sete trabalhos utilizando microssatélites em dez espécies (Barbará *et al.*, 2007; 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009; 2011; Boisselier-Dubayle *et al.*, 2010; Zanella *et al.*, 2011; Carlier *et al.*, 2012) e sete com aloenzimas (Soltis *et al.*, 1987; Murawski e Hamrich, 1990; Izquierdo e Piñero, 2000; Sarthou *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2004; González-Astorga *et al.*, 2004; Hmeljevski *et al.*, 2010).

4. Filogeografia e padrões históricos da Mata Atlântica

Filogeografia é a área de estudo que trata dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas em nível intraespecífico. A análise e interpretação da distribuição de linhagens, usualmente, requerem informações da genética molecular, genética de populações, filogenias, demografia e geografia histórica, sendo a filogeografia uma disciplina integrativa (Avice, 1998). Estudos filogeográficos têm sido utilizados para investigar os efeitos de mudanças climáticas do passado, na estrutura genética de espécies animais e vegetais. Estes estudos permitem-nos fazer inferências sobre a evolução de espécies dentro de biomas, e isto pode ser usado para auxiliar a traçar estratégias de conservação das mesmas (Bermingham e Moritz, 1998; Ramos *et al.*, 2007). Os estudos filogeográficos têm gerado importantes contribuições para a compreensão da distribuição das espécies no passado e no presente, e

também tem sido uma importante fonte de informação sobre eventos do passado, permitindo a identificação de refúgios do Pleistoceno, rotas pós-glaciais e zonas de contato secundário (Hewitt, 1996; Comes e Kadereit, 1998; Cruzan e Templeton, 2000).

Estudos recentes têm direcionado seu enfoque no entendimento dos efeitos das mudanças climáticas e glaciações durante o Pleistoceno na diversificação de espécies, principalmente no hemisfério norte. A maioria destes estudos investigou a distribuição geográfica de linhagens genéticas e têm demonstrado um papel significativo das mudanças climáticas do passado na formação da história e da estrutura populacional das espécies (Moraes *et al.*, 2009). Uma atenção menor tem sido dada para regiões tropicais da América do Sul, principalmente com plantas (Lira *et al.*, 2003; Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2007; Palma-Silva *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Novaes *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011; Turchetto-Zolet *et al.*, 2012). Porém, ainda mais escassos são os estudos envolvendo análises de filogeografia para plantas que ocorrem na porção Sul da Mata Atlântica (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná): *Podocarpus* (Ledru *et al.*, 2007), *Passiflora actinia* e *P. elegans* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005) e *Vriesea gigantea* (Palma-Silva *et al.*, 2009).

A Mata Atlântica é um complexo conjunto de ecossistemas de grande importância por abrigar uma parcela significativa da diversidade biológica mundial, sendo também um dos biomas mais ameaçados da América do Sul. Esse bioma cobria originalmente 15% do território nacional, ocupando cerca de 1,3 milhões de Km², entre as latitudes 6 e 30° S ao longo da costa leste brasileira e chegando até o Paraguai e a Argentina (SOS Mata Atlântica e INPE, 2009). As características geográficas da Mata Atlântica, combinadas com a grande variação em altitude e o regime de chuvas, favoreceram a ocorrência de uma alta diversidade e endemismo (Oliveira-Filho e Fontes, 2000, Myers *et al.*, 2000). Seu grau de endemismo pode atingir 90% para alguns organismos, e sua média geral é de 50%, sendo superado apenas pela Amazônia (Costa *et al.*, 2000), incluindo mais de 20.000 espécies de plantas. A maior ameaça à biota da Mata Atlântica é a perda de habitat e o alto grau de fragmentação (Myers *et al.*, 2000). De acordo com a Fundação SOS Mata Atlântica e INPE (2009), restam de 7 a 8% da cobertura original da Mata no país. A maioria dos remanescentes florestais existe em pequenos fragmentos (menores que 100 hectares), isolados uns dos outros, e compostos por florestas secundárias em estágio de sucessão inicial ou médio. Já os poucos fragmentos grandes sobreviveram em locais onde

os terrenos íngremes dificultaram a ocupação humana (Ribeiro *et al.*, 2009). A atual fragmentação da Mata Atlântica levou à perda da biodiversidade e muitas espécies estão ameaçadas de extinção (Myers *et al.*, 2000).

A Mata Atlântica ocupa principalmente a borda leste brasileira, uma área de topografia complexa ao longo de distâncias geográficas curtas que foram moldadas pela atividade das placas tectônicas no Terciário e das transgressões marinhas no Quaternário (Martins e Coutinho, 1981). Esta região é caracterizada por forte sazonalidade, gradientes ambientais (decorrente da topografia) e chuvas orográficas influenciadas pelos ventos vindos do Atlântico. Além disso, bacias hidrográficas e cadeias de montanhas frequentemente delimitam a distribuição das espécies da Mata Atlântica, atuando como barreiras ao fluxo gênico (Thomé *et al.*, 2010), entretanto, poucos estudos têm estabelecido eventos geomorfológicos como promotores de diversificação alopátrica neste bioma (Costa, 2003; Pellegrino *et al.*, 2005; Graziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; 2008). Essa diversidade de paisagens aliadas a peculiaridades de micro-habitats são responsáveis pela alta taxa de endemismo e biodiversidade da região (Martins, 2011).

Estudos envolvendo a diversificação de espécies da Mata Atlântica demonstram que não há um acordo sobre os mecanismos gerais que explicam a origem de sua diversidade. Uma das hipóteses é a de que espécies neotropicais teriam surgido principalmente durante o Quaternário (nos últimos dois milhões de anos), favorecidas pela alternância do clima glacial/interglacial (Bennett, 2004). Por outro lado, há a teoria de uma origem mais antiga, no Terciário, ligada principalmente a mudanças paleogeográficas (Willis e Niklas, 2004). Estimativas do tempo de diversificação dos Neotrópicos indicam que as linhagens originaram-se continuamente desde o Eoceno tardio, início do Oligoceno até o Pleistoceno (Rull, 2008). O mecanismo comumente invocado para a diversificação na América do Sul é o isolamento de táxons em áreas de habitat estáveis durante as oscilações climáticas do Quaternário (a hipótese de refúgios do Pleistoceno; Haffer, 1969). Refúgios permitiram a persistência em alopatria de populações durante períodos climáticos desfavoráveis e devem mostrar índices de diversidade e endemismos maiores que áreas menos estáveis, as quais não serviram como refúgios (Bennett e Provan, 2008).

Um estudo de paleomodelagem realizado para a Mata Atlântica indica severas contrações florestais ao sul do estado de São Paulo e áreas estáveis de florestas ao norte durante o último máximo glacial, seguido de expansão durante o Holoceno (Carnaval e

Moritz, 2008). Este cenário é compatível com a divergência genética de linhagens observada em vários táxons do norte da Mata Atlântica (Costa, 2003; Pellegrino *et al.*, 2005; Moraes-Barros *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012), mas linhagens divergentes também têm sido observadas no sul da Mata Atlântica (Grazziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2009), onde não foram previstos refúgios nos paleomodelos. Porém, Thomé *et al.* (2010), no estudo de paleomodelagem para espécies de sapos do gênero *Rhinella*, encontraram a ocorrência de refúgios para a porção sul da Mata Atlântica na região centro-norte do estado do Rio Grande do Sul e oeste de Santa Catarina, quase no centro do Paraná e a região litorânea do sul e sudeste do Brasil, do norte de Santa Catarina até São Paulo. Resultados similares foram encontrados por Amaro *et al.* (2012), com a permanência de populações mais ao sul da Mata Atlântica durante o Pleistoceno. Porém, no estudo realizado por Porto *et al.* (2012) com 14 espécies, nenhum refúgio ao sul da Mata Atlântica foi observado. Os autores discutiram que o poder dos modelos de refúgios quando utilizados para espécies de distribuição muito restrita pode ser mais fraco do que para espécies de distribuição geográfica mais ampla, entretanto, a ocorrência de refúgios ao sul da Mata Atlântica é esperada devido a dados paleoecológicos, de diversidade e endemismo (ver Porto *et al.*, 2012). Para a Mata Atlântica é improvável que a hipótese de refúgios ou barreiras explique sozinha os padrões gerais de diversificação de linhagens (Thomé *et al.*, 2010), o que demonstra o pobre entendimento dos padrões evolutivos históricos dessa região.

Em Bromeliaceae apenas dois trabalhos de filogeografia foram desenvolvidos até o momento, um deles com *Pitcairnia geyskesii*, uma espécie endêmica da Guiana Francesa, encontrada em afloramentos rochosos (Boisselier-Dubayle *et al.*, 2010) e outro com *Vriesea gigantea*, uma espécie endêmica da Mata Atlântica (Palma-Silva *et al.*, 2009), no qual foi observado uma divisão filogeográfica entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro (latitude 23°S), provavelmente refletindo um isolamento das populações no passado, as quais teriam sobrevivido em mais de um refúgio durante as oscilações climáticas do Pleistoceno. Também, foi encontrada uma recente expansão demográfica das populações em direção ao Sul e áreas mais ao norte parecem ter permanecido estáveis durante as oscilações climáticas do Pleistoceno.

5. Hibridação

Hibridação é um fenômeno natural relativamente bem conhecido e documentado, tendo uma função importante na evolução das plantas (Stebbins 1959; Grant 1981; ver Soltis e Soltis, 2009) e sendo responsável pela diversificação de uma grande proporção de angiospermas (50 a 70%; Ellstrand *et al.*, 1996; Rieseberg, 1997). O mecanismo mais comumente conhecido de especiação de plantas é através de hibridação aloploide (Soltis e Soltis, 1999), porém também há evidências da ocorrência de novas espécies com o mesmo número de ploidia dos parentais (Rieseberg *et al.*, 1995; Arnold, 1997; Ungerer *et al.*, 1998; Wolfe *et al.*, 1998; Buerkle *et al.*, 2000). Estes estudos demonstram que a hibridação não é apenas um tipo de “ruído evolutivo” com pouco significado evolutivo, como afirmam alguns autores (Mayr, 1992; Schemske, 2000) e sim uma poderosa força evolutiva que cria oportunidades para a diversificação adaptativa e especiação em populações naturais (Anderson, 1949; Arnold, 1997; Rieseberg e Carney, 1998; Rieseberg *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2010; Palma-Silva *et al.*, 2011).

Os processos de hibridação e suas consequências podem ser estudados pela avaliação da arquitetura genética de zonas híbridas naturais (Rieseberg *et al.*, 2000). Uma zona híbrida ocorre quando duas espécies se encontram, cruzam e produzem descendentes viáveis (Harrison, 1990). O estudo da arquitetura genética de zonas híbridas possibilita acessar uma grande variedade de genótipos que podem ter sido produzidos por muitas gerações de recombinação, sendo considerados laboratórios naturais para os estudos de barreiras ao fluxo gênico (Barton e Hewitt 1989; Lexer *et al.*, 2005). O estudo do fluxo gênico interespecífico pode fornecer importantes informações quanto ao tipo e poder do isolamento reprodutivo entre as espécies que estão hibridando (Martinsen *et al.*, 2001; Lexer *et al.*, 2005; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Palma-Silva *et al.*, 2011), também permite avaliar o sucesso reprodutivo do genótipo híbrido adulto em condições naturais, o que é muito difícil de conseguir para espécies de geração longa ou para espécies difíceis de serem manejadas de forma experimental (Rieseberg e Buerkle, 2002; Lexer *et al.*, 2003, 2005), como é o caso das bromélias.

Os estudos de zonas híbridas apresentam uma riqueza de informações sobre os fatores que favorecem o fluxo gênico interespecífico, a natureza das barreiras pré- e pós-zigóticas e a estabilidade de zonas híbridas (Rieseberg e Carney, 1998; Buggs, 2007;

Currat *et al.*, 2008). Estes estudos fornecem informações sobre o papel da hibridização em populações naturais contemporâneas, bem como eventos de hibridação no passado. A estrutura e estabilidade das zonas híbridas dependem da extensão em que as espécies parentais são genética e ecologicamente distintas, além do valor adaptativo dos híbridos. O grau de isolamento reprodutivo entre espécies relacionadas é um fator importante que influencia na integridade genética das espécies e na probabilidade de formação de híbridos (Grant, 1981; Harrison, 1993; Avise, 1994; Arnold, 1997; Chari e Wilson, 2001; Mráz *et al.*, 2005; Stökl *et al.*, 2005). Este grau de isolamento reprodutivo é ainda mais crítico entre espécies simpátricas (Pascarella, 2007).

Marcadores moleculares representam uma ferramenta poderosa no estudo da hibridação, uma vez que são capazes de detectar até mesmo baixos níveis de introgressão. O estudo combinado de marcadores nucleares e plastidiais têm sido utilizados com sucesso na detecção de efeitos combinados de seleção e fluxo gênico (Barton e Hewitt, 1985; Lexer *et al.*, 2005). O genoma plastidial não sofre recombinação e é herdado somente de um dos parentais (nas angiospermas, em geral, a herança é materna), indicando a direção do evento de introgressão, sendo a introgressão citoplasmática frequentemente utilizada como evidência de hibridação antiga (Rieseberg e Brunfeldt, 1992).

Bromeliaceae possui grande compatibilidade reprodutiva entre seus gêneros e espécies, produzindo facilmente híbridos artificiais (McWilliams, 1974; Vervaeke *et al.* 2004). No entanto, poucos casos de hibridação natural foram registrados para a família (gêneros *Tillandsia*: Gardner, 1984; Luther, 1985; *Vriesea*: Read, 1984; *Pitcairnia*: Luther, 1984; Wendt *et al.*, 2000; Palma-Silva *et al.*, 2011). Wendt *et al.* (2008) estudaram 42 espécies de bromélias simpátricas e verificaram um fraco isolamento pré-zigótico entre as espécies estudadas.

O estudo do isolamento reprodutivo tem recebido grande atenção de pesquisadores nos últimos anos, por ser um processo essencial na especiação, principalmente na tentativa de entender como a ecologia e a genética estão atuando sobre as barreiras evolutivas. Muitos são os componentes pré- e pós-zigóticos responsáveis pelo isolamento reprodutivo entre espécies de plantas, como por exemplo, morfologia floral, coloração das pétalas, composição do néctar, fenologia floral, número cromossômico entre outros (Widmer *et al.*, 2009). Em plantas, muitas vezes, o isolamento reprodutivo ocorre pela interação entre esses fatores e não pela atuação de uma única barreira ao fluxo gênico interespecífico

(Coyne e Orr, 2004; Rieseberg e Willis, 2007; Widmer *et al.*, 2009).

6. Objetivos

A presente tese está inserida em um projeto amplo que visa contribuir para os estudos genéticos e biológicos de plantas neotropicais, com ênfase na família Bromeliaceae. A família Bromeliaceae é um modelo interessante para o estudo dos padrões filogeográficos da Mata Atlântica e de barreiras reprodutivas, por ser uma família que sofreu uma radiação adaptativa recente, tendo a Mata Atlântica como um de seus centros de diversidade. Sendo assim, a presente tese tem como objetivo geral contribuir com informações que auxiliarão na compreensão dos padrões históricos que modelaram a Mata Atlântica, dos mecanismos de especiação, isolamento reprodutivo e coesão de espécies.

Objetivos específicos

- Revisar e compilar os dados de diversidade genética, biologia reprodutiva, citogenética, evolução e conservação sobre a família Bromeliaceae;
- Inferir sobre os padrões de diversidade genética de *V. carinata* e *V. incurvata*, através de marcadores plastidiais e nucleares;
- Compreender os padrões filogeográficos das espécies;
- Comparar os padrões filogeográficos observados para essas espécies com padrões descritos para a Mata Atlântica;
- Identificar se há ocorrência de hibridação natural em populações simpátricas de *V. carinata* e *V. incurvata*, através de marcadores moleculares nucleares e plastidiais;
- Estimar a diversidade e estruturação genética dos indivíduos puros de *V. carinata*, *V. incurvata* e híbridos e avaliar a composição genômica dos híbridos;
- Avaliar os padrões de fluxo gênico interespecífico nuclear e plastidial nas populações simpátricas e definir se a introgressão é uni ou bidirecional;
- Elucidar aspectos evolutivos do sistema reprodutivo e das barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas que estão atuando para a manutenção das espécies.

Capítulo II

Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae

Artigo publicado no periódico *Genetics and Molecular Biology*