

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDO FILOGEOGRÁFICO E HIBRIDAÇÃO EM UM GRUPO DE ESPÉCIES
DE *VRIESEA* (BROMELIACEAE): CONTRIBUIÇÕES PARA A
DIVERSIFICAÇÃO DO GÊNERO E HISTÓRIA EVOLUTIVA DA MATA
ATLÂNTICA**



CAMILA DE AGUIAR MELO

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**ESTUDO FILOGEOGRÁFICO E HIBRIDAÇÃO EM UM GRUPO DE
ESPÉCIES DE *VRIESEA* (BROMELIACEAE): CONTRIBUIÇÕES
PARA A DIVERSIFICAÇÃO DO GÊNERO E HISTÓRIA
EVOLUTIVA DA MATA ATLÂNTICA**

Camila de Aguiar Melo

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 Doutora em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Prof^a Dra. Fernanda Bered

Coorientadora: Prof^a Dra. Andrea Ferreira da Costa

Porto Alegre, dezembro de 2020

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. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ - processos 141892/2016-1 e 479413/2011-8) e PROGRAMA CAPES/STINT, EDITAL n°. 28/2018, Número do Projeto 88881.304776/2018-01. A doutoranda obteve bolsa de estudos do CNPQ (50 meses).

*Aos meus pais, Sandra e Carlinhos, e a
minha cachorrinha Madalena, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora da Aparecida por terem me conduzido nesta jornada de aprendizado profissional e de autoconhecimento.

À minha orientadora, Fernanda Bered, toda minha gratidão por ter me acolhido desde o mestrado, e assim me conceder a oportunidade de evoluir como profissional e pessoa. Por toda a sua dedicação, compreensão, atenção, paciência, carinho e ensinamentos, muito obrigada.

À minha coorientadora, Andrea Costa, por ter me acolhido junto ao seu laboratório e sua família, aos quais também sou muito grata por todo o carinho com que fui recebida. Pelos campos memoráveis, regados de aprendizado e alegria, com direito a capa de chuva improvisada, bis, e lugares e plantas incríveis. Por todo o seu carinho, dedicação, compreensão e ensinamentos, muito obrigada.

À Professora Márcia Margis, pelo incentivo e orientação no início do doutorado, muito obrigada.

Aos meus pais, Sandra e Carlinhos, pelo amor, apoio e incentivo incondicional de sempre, e ao meu irmão Felipe, vocês são a minha base, meu abrigo e minha inspiração.

À minha cachorrinha Madalena, que apesar de não ler e entender estas palavras entende muito de amor e companheirismo, e foi o que me manteve firme por inúmeras vezes ao longo desta jornada.

À minha Vó Rosalina, por todo o amor e carinho, pelas orações e preocupações. À minha Dinda Adriana, pelo amor e dedicação, e a minha Tia Carmem (Caca) pelo carinho e pelas caronas.

Ao Seu Neuso e a Dona Izabel, pelo carinho, atenção e convivência.

À Luiza Domingues Hirsch, pela amizade, carinho, convivência, por toda a ajuda, desde saídas de campo às análises, pela troca de ideias e aprendizado, pelas conversas e desabafos, pelas risadas e choros.

À Camila Zanella, pela parceria e disponibilidade de sempre ajudar e trocar ideias.

Às gurias do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, Luiza, Laís, Renata e Cristina, pela ajuda, troca de ideias e conversas, muito obrigada.

À Márcia Goetze pela ajuda e esclarecimentos das análises do primeiro artigo.

Ao pessoal do grupo de Genética Vegetal com os quais convivi, pelas conversas e troca de ideias. A Nicole e ao Osmani por terem compartilhado o protocolo de extração, que muito me ajudou. À técnica Letícia Gal, por toda a sua dedicação, muito obrigada.

À Beatriz Neves, pela ajuda e troca de ideias e informações, e, ao Igor Kessous, pela ajuda nas saídas de campo e com a figura da introdução.

À Juliana Troleis, ao Professor Jorge Mariath, a Fernanda Nogueira e ao Ezequiel pelo auxílio com as plantas e utilização da casa de vegetação.

Ao PPGBM pela oportunidade em realizar o doutorado, e aos Professores pelos conhecimentos transmitidos, em especial a Professora Eliane pela atenção e ajuda na coleta de flores.

Ao Elmo e ao Gabriel pela dedicação, carinho e atenção com que sempre nos atendem, por e-mail ou na secretaria, pelo suporte burocrático e auxílio na solução de problemas.

Ao Parque Estadual da Serra do Mar e a Estação Biológica da Boraceia. À UFRGS e ao Museu Nacional da UFRJ pelo suporte nas saídas de campo, assim como todas as pessoas que auxiliaram de alguma forma na realização das coletas.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese, seja por palavras de incentivo, pela troca de ideias ou no auxílio direto.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL	12
1.0 A biodiversidade da Mata Atlântica.....	13
1.1 A Família Bromeliaceae.....	13
1.2 Gênero <i>Vriesea</i> Lindl.....	15
1.3 Filogeografia em bromélias e padrões históricos da Mata Atlântica.....	19
1.4 Barreiras reprodutivas e Híbridação em bromélias.....	20
1.5 Objetivos.....	22
1.5.1 Objetivos Específicos.....	22
CAPÍTULO II: Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in <i>Vriesea incurvata</i> suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest	24
CAPÍTULO III: Porous reproductive barriers evidenced by high interspecific gene flow in <i>Vriesea</i> (Bromeliaceae) sympatric species from the southern Atlantic Forest	46
CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

RESUMO

Bromeliaceae é uma das famílias de angiospermas com maior diversidade morfológica e ecológica, podendo habitar desde ambientes extremamente secos até florestas úmidas. *Vriesea* é o segundo maior gênero da subfamília Tillandsioideae, com 231 espécies, e é composto principalmente por espécies de hábito epífita ocupando ambientes mesófilos, sendo a Mata Atlântica o principal centro de diversidade, com 166 espécies. Apesar do polifiletismo do gênero, é possível observar grupos monofiléticos de espécies de ocorrência no leste brasileiro. Um desses grupos é denominado de “grupo das infladas”, cujas espécies, dentre outras características, apresentam inflorescência simples, brácteas florais vermelhas e infladas, e flores tubulares com corola amarela. Esta tese é composta por dois manuscritos que buscam entender os padrões históricos, de diversidade e estrutura genética, bem como o fluxo gênico interespecífico e o grau de isolamento reprodutivo em espécies deste grupo. No Capítulo II buscando compreender os padrões históricos, a estrutura e diversidade genética de populações de *V. incurvata* na porção sul da Mata Atlântica, de onde essa espécie é endêmica, foram analisados duas regiões plastidiais e 13 marcadores nucleares microssatélites, além de análises demográficas e de modelagem de nicho ecológico. Os resultados mostraram uma falta de estruturação filogeográfica com um alto compartilhamento de haplótipos entre as populações e uma diversidade genética variando de moderada a alta em ambos os genomas analisados. A modelagem de nicho ecológico indicou que não houve grandes alterações das áreas mais adequadas para a distribuição da espécie nos períodos do Último Máximo Glacial e do Holoceno Médio em relação à distribuição atual. Assim, após a colonização de *V. incurvata*, a porção sul da Mata Atlântica se manteve historicamente estável para sua ocupação, corroborando a estruturação filogeográfica encontrada. No Capítulo III a fim de avaliar o fluxo gênico entre espécies do “grupo das infladas”, foram selecionadas três localidades na Mata Atlântica onde ocorrem populações simpátricas das espécies *V. taritubensis* var. *patens*, *V. simplex*, *V. carinata*, *V. agostiniana*, *V. inflata* e *V. incurvata*, e utilizados 12 marcadores nucleares do tipo microssatélites. Além disso, para analisar as diferenças morfológicas entre as espécies em cada localidade, foram utilizadas 10 variáveis, quatro relacionadas à parte vegetativa e seis a parte reprodutiva das plantas. Os resultados indicaram uma baixa estruturação populacional e uma alta taxa de hibridação entre as espécies de *Vriesea* nas localidades estudadas, sugerindo que as barreiras

reprodutivas entre essas espécies são permeáveis. Foram observados alguns indivíduos híbridos com morfologia atípica, no entanto a maioria apresentou características morfológicas semelhantes aos parentais. De modo geral, os resultados obtidos nesta tese contribuem com a compreensão dos processos evolutivos envolvidos na diversificação do gênero *Vriesea*, especificamente em espécies do “grupo das infladas”, bem como com a elucidação dos padrões históricos e evolutivos envolvidos na porção sul da Mata Atlântica.

ABSTRACT

Bromeliaceae is one of the most morphological and ecological diverse family of flowering plants, which inhabits environments from extremely dry to humid forests. *Vriesea* is the second largest genus of Tillandsioideae subfamily with 231 species, and is composed mainly by epiphytic plants in mesophilic environments, being Atlantic Forest the main center of diversity, with 166 species. Despite the polyphyly of this genus, it is possible to observe monophyletic groups of species from eastern Brazil. One of these groups are the “inflated group”, which among other characteristics, presents simple inflorescence, red and inflated floral bracts, and tubular flowers with yellow corolla. The present thesis consists of two manuscripts that seek to understand the historical patterns, genetic diversity and structure, as well as the interspecific gene flow and the degree of reproductive isolation in species of this group. In Chapter II, seeking to understand the historical patterns, structure and genetic diversity of *V. incurvata* populations from southern portion of the Atlantic Forest, where it is endemic, two plastid regions and 13 nuclear microsatellite markers were analyzed, in addition to demographic and ecological niche modeling. The results showed a lack of phylogeographic structure with high haplotypes sharing among populations and the genetic diversity ranging from moderate to high in both analyzed genomes. The ecological niche modeling indicated no major changes in the most suitable areas for the distribution of this species in the Last Glacial Maximum and the Mid Holocene periods from the current distribution. Thus, after the colonization of *V. incurvata*, the southern portion of the Atlantic Forest remained historically stable for its occupation, corroborating the finding of no phylogeographic structure. In Chapter III, in order to assess the gene flow between species of the “inflated group”, three localities with sympatric populations of *V. taritubensis* var. *patens*, *V. simplex*, *V. carinata*, *V. agostiniana*, *V. inflata* e *V. incurvata* species in the Atlantic Forest were selected and analysed using 12 microsatellite nuclear markers for this purpose. In addition, to analyze the morphological differences between species in each locality, 10 variables were used, four related to the vegetative and six to the reproductive plants structures. The results indicated a low population structure and a high percentage of hybridization among the *Vriesea* species in the studied localities, suggesting that the reproductive barriers can be considered permeable. It was observed some hybrid individuals with atypical morphology, but the majority presented morphological characteristics of purebreds parental. In general, the results obtained in this thesis

contribute to understanding the evolutionary processes involved in *Vriesea* genus diversification, specially in species from “inflated group”. Also, this study contributed to better understand the historical and evolutive patterns involved in the southern portion of Atlantic Forest.

CAPÍTULO I
INTRODU O GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1.0 A biodiversidade da Mata Atlântica

A Mata Atlântica é uma das maiores florestas tropicais das Américas, abrangendo 17 estados brasileiros ao longo de toda a costa litorânea, estendendo-se também a planaltos e serras no interior do continente, chegando a regiões do Paraguai e Argentina (Ribeiro *et al.*, 2009; SOSMA/INPE, 2020). Atualmente, no Brasil, devido à alta pressão antrópica sofrida desde a época da colonização, estima-se que exista apenas cerca de 12% da floresta em comparação com sua cobertura vegetal original (Morellato e Haddad, 2000; Ribeiro *et al.*, 2011a; SOSMA/INPE, 2020). A ampla variação de latitude (3°S a 30°S), longitude (35°O a 60°O), altitude (0 – 2.900m acima do nível do mar) e precipitação anual (1.000 a 4.200 milímetros), torna a Mata Atlântica um ambiente altamente heterogêneo, formando um mosaico de tipos vegetacionais que inclui desde florestas ombrófilas (densa, aberta e mista), florestas estacionais (decidua e semidecidua), campos de altitude, até mangues e restingas (Câmara, 2003; Ribeiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011a). Tais características geográficas favorecem a alta diversidade e endemismo de espécies da flora e fauna, tornando esta floresta um dos *hotspots* mundiais para biodiversidade (Morellato e Haddad, 2000; Myers *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2009).

1.1 A família Bromeliaceae

Bromeliaceae apresenta 3.652 espécies distribuídas em 78 gêneros (Gouda *et al.*, [cont. updated]), e é caracterizada por uma recente radiação adaptativa, tornando a família uma das mais diversas morfológica e ecologicamente entre as angiospermas (Benzing, 2000; Givnish *et al.*, 2011). As inovações apresentadas por estas plantas ao longo do tempo, tais como o epifitismo, a formação de um “tanque” através da disposição rosulada das folhas, a capacidade dos tricomas foliares de absorver água e nutrientes, a polinização por vertebrados e o surgimento do sistema CAM de fotossíntese (metabolismo ácido das crassuláceas), permitiram as bromélias estabelecerem-se nos mais variados ambientes, de xéricos à mesofíticos, e estão relacionadas às altas taxas de diversificação observadas na família (Givnish *et al.*, 2007; 2014; Silvestro *et al.*, 2013). A evolução em uma ampla diversidade de cores e formas de estruturas florais atraíram os mais variados polinizadores, como insetos, morcegos e beija-flores (Benzing, 2000). Os beija-flores, no entanto, podem ser considerados os principais agentes polinizadores da família (Benzing, 2000; Dias *et al.*,

2014). Em um estudo de polinização com beija-flores, realizado em regiões do sudeste brasileiro, na Mata Atlântica, as bromélias representaram 36% da flora ornitófila e 33% das flores mais ricas em néctar (Buzato *et al.*, 2000). Ecologicamente, além do néctar utilizado como recompensa para os polinizadores, essas plantas possuem frutos carnosos que são consumidos e dispersados por aves, e o tanque formado permite o armazenamento de água e nutrientes, que além de servir para sua própria nutrição, fornece um microambiente favorável que proporciona alimento, abrigo e local para reprodução para diversos animais associados (Reitz, 1983; Benzing, 2000; Dias *et al.*, 2014).

As bromélias são quase exclusivas do Neotrópico, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos (estados do Texas, Virgínia e Califórnia) até o norte da Patagônia, na Argentina (Benzing, 2000). A exceção é a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr. que ocorre no Oeste da África, provavelmente devido a um evento recente de dispersão à longa distância (Benzing, 2000; Givnish *et al.*, 2004). São considerados quatro centros de diversidade para a família, os Andes, a América Central, o Planalto das Guianas, e o Escudo brasileiro (Givnish *et al.*, 2011). O Brasil apresenta uma grande diversidade de bromélias com 51 gêneros (23 endêmicos) e 1.399 espécies (1.196 endêmicas) (Flora do Brasil 2020). Especificamente, a Mata Atlântica apresenta uma grande riqueza de espécies (Martinelli *et al.*, 2008), sendo as epífitas dentre as Angiospermas com o maior número de registros neste bioma (37,6%) (Ramos *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, Bromeliaceae estava dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith e Downs, 1974; 1977; 1979). No entanto, análises filogenéticas realizadas com marcadores plastidiais indicaram o reconhecimento de oito subfamílias (Givnish *et al.*, 2007; 2011): Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Bromelioideae. Estima-se que as bromélias surgiram no Escudo das Guianas há cerca de 100 milhões de anos atrás (Ma), durante o Período Cretáceo, com as subfamílias existentes começando a divergir há apenas 19 Ma (Givnish *et al.*, 2011). Os mesmos autores sugerem que as bromélias começaram a ocupar os Andes, a Amazônia, a América Central, o Caribe e o Escudo brasileiro entre 15 e 10 Ma.

A subfamília Tillandsioideae sempre foi reconhecida como monofilética e é a que apresenta a distribuição geográfica mais ampla entre as demais. Pode ser dividida em

quatro tribos: Glomeropitcairnieae, Catopsideae, Tillandsieae e Vrieseae, sendo que estas duas últimas formam o chamado “core Tillandsioideae” (Barfuss *et al.*, 2005; 2016). Givnish *et al.* (2011), baseados em oito marcadores plastidiais, sugerem que o ancestral das linhagem do “core Tillandsioideae” provavelmente surgiu nos Andes há aproximadamente 14,2 Ma, com os gêneros atuais começando a divergir entre si há aproximadamente 8,7 Ma, expandindo-se pela América Central, litoral norte da América do Sul e Caribe. Todavia, Kessous *et al.* (2020), através de uma abordagem biogeográfica, sugerem que um evento vicariante (Mar do Paraná) ocorrido por volta de 10 Ma, teria ocasionado a divergência de grupos do “core Tillandsioideae”, com membros da subtribo Cipuropsidinae e tribo Tillandsieae colonizando os Andes, e a subtribo Vrieseinae (Vrieseae), ao qual *Vriesea* pertence, o Escudo brasileiro. Os autores também sugerem que o ancestral comum de Vrieseinae surgiu nos domínios da Mata Atlântica e Chaco durante o Plioceno (5,3 – 2,6 Ma), com os grupos infragen ricos e complexos de espécies divergindo no Pleistoceno (2,6 – 0,1 Ma).

1.2 G nero *Vriesea* Lindl.

Vriesea   o segundo maior gênero de Tillandsioideae com 231 espécies (Gouda et al. [cont. updated]). O gênero   composto principalmente por plantas com hábito ep fito ocupando ambientes mesófilos, mas também podem ser terrestres e rupícolas e ocorrer em campos rupestres, campos de altitude e *inselbergs* (Costa *et al.*, 2014). A distribui o geográfica das espécies varia desde casos de ampla distribui o até microendemismos (Costa *et al.*, 2014). Dois centros de diversidade são reconhecidos para o gênero, o primeiro do norte da América do Sul, América Central e o Caribe (Smith e Downs, 1977), e o segundo no leste do Brasil, onde 87% das espécies ocorrem (Costa *et al.*, 2015; Gomes-da-Silva e Souza-Chies, 2017). Apresenta maior riqueza na Mata Atlântica, com 166 espécies (Martinelli *et al.*, 2008), sendo o gênero ep fitico de Bromeliaceae com mais registros de ocorrência deste bioma (37%) (Ramos *et al.*, 2019), podendo também ser encontradas nos biomas Cerrado, Caatinga, Amazônia e Pampa (Flora do Brasil 2020).

O gênero foi historicamente dividido em duas se es: *Vriesea* sect. *Vriesea* com flores de antese diurna, brácteas florais coloridas (do vermelho ao amarelo), pétalas linguladas, e estames exsertos; e *V.* sect. *Xiphion* com flores de antese noturna, brácteas florais verdes e castanhas, pétalas obovais e estames inclusos (Smith e Downs, 1977; Costa *et al.*, 2014).

Essas duas seções foram originalmente descritas com características claramente associadas à síndromes de polinização por beija-flores (*V. sect. Vriesea*) ou morcegos (*V. sect. Xiphion*); no entanto, esta classificação formal das espécies também utilizou a posição dos estames (exsertos ou inclusos) levando a equívocos taxonômicos em algumas espécies com morfologia floral intermediária (Costa *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2020). Além disso, as duas seções não puderam ser recuperadas em grupos monofiléticos, tanto em filogenias morfológicas (Costa *et al.*, 2015), quanto naquelas baseadas em marcadores moleculares (Barfuss *et al.*, 2016; Gomes-da-Silva e Souza-Chies, 2017; Machado *et al.*, 2020). Na filogenia realizada com caracteres morfológicos (Costa *et al.*, 2015), apesar da evidente homoplasia em caracteres descritos tradicionalmente para delimitar as duas seções, foi possível observar em clados diferentes as espécies atribuídas a uma ou outra seção. Neves *et al.* (2020) ressaltaram a importância da síndrome de polinização (beija-flor x morcego) na diferenciação de espécies de *Vriesea*, o que foi suportado tanto por análises genéticas quanto por traços florais distintos nas diferentes síndromes, sugerindo o polinizador como o agente condutor do isolamento ecológico no gênero. Os mesmos autores também sugeriram uma possível transição entre as diferentes síndromes nas espécies que apresentam traços florais mistos.

A recente diversificação de *Vriesea* é evidenciada pelo seu polifiletismo, baixa resolução infragenérica, bem como a difícil delimitação entre algumas espécies (Barfuss *et al.*, 2005, 2016; Costa *et al.*, 2014, 2015; Gomes-da-Silva e Souza-Chies, 2017; Machado *et al.*, 2020). No entanto, é possível observar alguns grupos monofiléticos, sendo formados por espécies que ocorrem no leste brasileiro, bem como complexos de espécies inseridos dentro destes grupos (Costa *et al.*, 2009; 2014; 2015; Kowalski e Tardivo, 2015; Gomes-da-Silva e Souza-Chies, 2017; Neves *et al.*, 2018; Machado *et al.*, 2020; Uribe *et al.*, 2020). Um dos grupos monofiléticos observados é o “grupo das infladas”, que compreende espécies com características como: inflorescência simples, brácteas florais em sua maioria infladas, involutas ou não, flores tubulares e com corola amarela, e a presença de estreitamento entre a lâmina e a bainha foliar (Costa *et al.*, 2014, 2015). Um dos complexos observados dentro deste grupo é o complexo *V. incurvata*, distribuído na Mata Atlântica, do Rio Grande do Sul (RS) ao Rio de Janeiro (RJ), e é composto pelas espécies *V. incurvata* Gaudich. (Figura 1A), *V. sucrei* L. B. Sm. & Read, *V. taritubensis* var. *taritubensis* E. Pereira & I. A. Penna, *V. taritubensis* var. *brevisejala* E. Pereira & I. A.

Penna, e *V. taritubensis* var. *patens* B. Neves & A. F. Costa (Figura 1B) (Neves *et al.*, 2018). A filogenia molecular de espécies do complexo, baseada em marcadores plastidiais, sugere que as espécies *V. incurvata* (Figura 1A) e as variedades de *V. taritubensis* sofreram um evento vicariante na região da Serra da Bocaina (estado de São Paulo-SP), por volta de 5 Ma, no Plioceno, ocasionando uma quebra do fluxo gênico, o que levou a diferenciação e estruturação destas espécies, com as variedades de *V. taritubensis* ocupando do norte de SP ao RJ, e *V. incurvata* do centro-sul de SP ao RS (Aguiar-Melo *et al.*, 2019; Neves *et al.*, 2019). Uma das características morfológicas que melhor distingue essas espécies é a morfologia da bráctea floral, com *V. incurvata* apresentando brácteas elípticas e mais largas em relação as variedades de *V. taritubensis*, que variam de brácteas lanceoladas à elípticas (Neves *et al.*, 2019). *Vriesea taritubensis* var. *patens* (Figura 1B) foi recentemente descrita sendo endêmica do Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia em SP, se diferenciando das demais espécies do complexo por apresentar inflorescência mais longa e estreita, muitas vezes patente e sigmoide, com numerosas flores eretas (Neves *et al.*, 2018).

Outras espécies que podemos observar dentro do “grupo das infladas” são, entre outras: *V. inflata* (Wawra) Wawra (que dá nome ao grupo), *V. carinata* Wawra, *V. simplex* (Vellozo) Beer e *V. agostiniana* E. Pereira (Figura 1) (Costa *et al.*, 2014; 2015; Neves *et al.*, 2020). Estas espécies apresentam folhas variando do verde claro ao escuro, podendo apresentar bainha foliar levemente arroxeadada, *V. simplex* também pode apresentar coloração avermelhada na face abaxial da lâmina; já as brácteas florais no geral são vermelhas, algumas apresentando ápice amarelo ou verde (Smith e Downs, 1977). *Vriesea inflata* (Figura 1C) ainda apresenta o pedúnculo da inflorescência um pouco mais curto que as demais, brácteas florais densamente imbricadas e infladas, e ocorre do Espírito Santo (ES) ao Paraná (PR) (Smith e Downs, 1977). Já *V. carinata* (Figura 1D) apresenta brácteas florais geralmente mais estreitas e encurvadas no ápice, distribuindo-se da Bahia (BA) ao RS (Smith e Downs, 1977). *Vriesea simplex* (Figura 1E) e *V. agostiniana* (Figura 1F) apresentam a inflorescência pêndula (Smith e Downs, 1977), e as características que melhor as diferencia é o tamanho e a forma da bráctea floral, com *V. agostiniana* apresentando bráctea com ápice encurvado e carenadas ao longo de todo o dorso, e *V. simplex* apresentando ápice ereto e carenada somente próximo ao ápice (Smith e Downs, 1977; Kessous *et al.*, 2018). *Vriesea simplex* distribui-se nos estados da BA, ES, RJ e SP

(Flora do Brasil 2020), já *V. agostiniana* está restrita a poucas populações em SP e RJ (Kessous *et al.*, 2018).

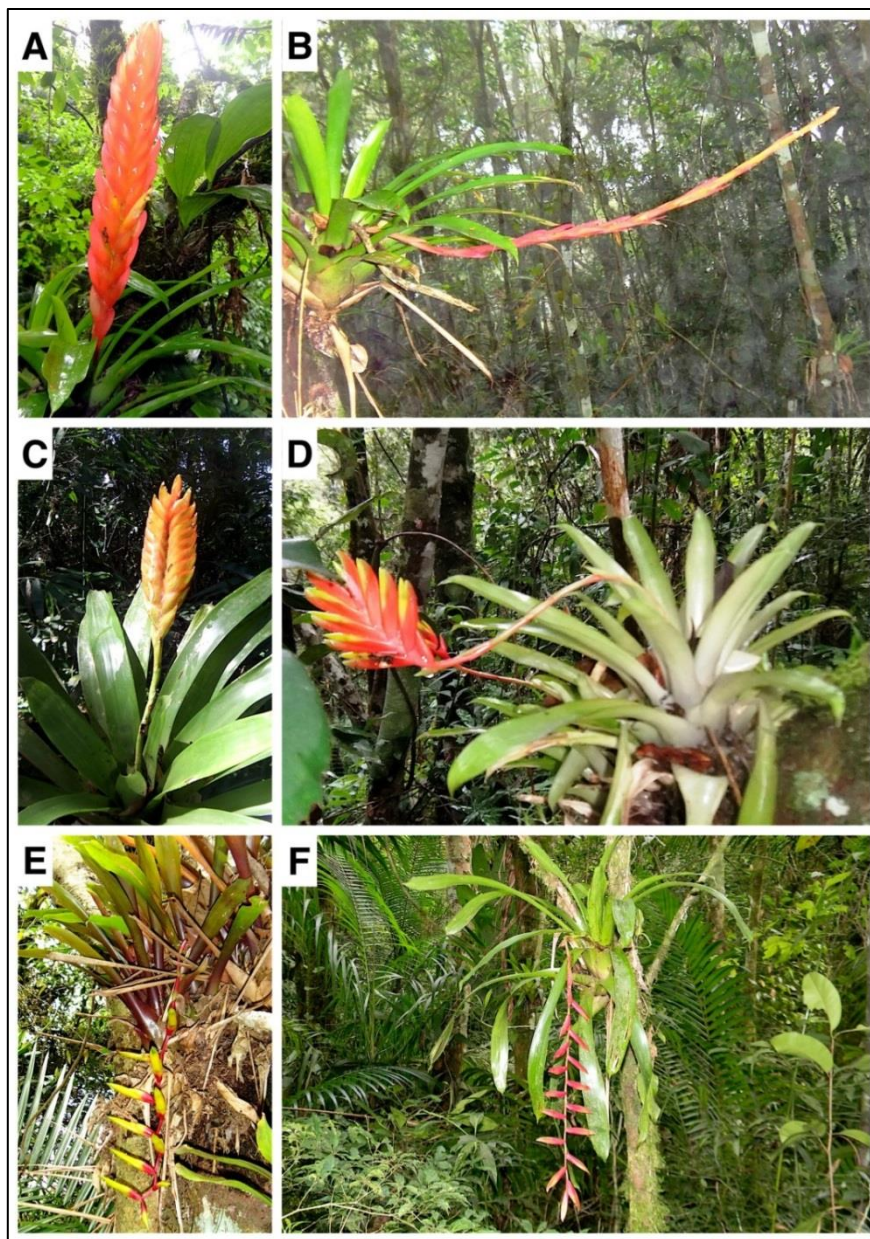


Figura 1. Espécies de *Vriesea* Lindl.: **A:** *V. incurvata* Gaudich.; **B:** *V. taritubensis* var. *patens* B. Neves & A. F. Costa; **C:** *V. inflata* (Wawra) Wawra; **D:** *V. carinata* Wawra; **E:** *V. simplex* (Vellozo) Beer e **F:** *V. agostiniana* E. Pereira. Registro: Camila de Aguiar Melo (A-E); Igor Kessous (F).

Como já mencionado, a delimitação de muitas espécies de *Vriesea* ainda é pouco compreendida (Costa *et al.*, 2014; 2015). Assim, quanto mais estudos com caracteres morfológicos e abordagens evolutivas diferentes, como filogeografia e hibridação, em

diferentes grupos, complexos e espécies, maior será a compreensão dos processos evolutivos envolvidos na diversificação do gênero, bem como os mecanismos que delimitam estas espécies.

1.3 Filogeografia em bromélias e padrões históricos da Mata Atlântica

A filogeografia é uma disciplina integrativa que está baseada nos processos que envolvem a origem e distribuição da biodiversidade, bem como de mudanças climáticas do passado que influenciaram na estruturação genética atual de populações de animais e plantas (Avise, 2009; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Estudos com abordagens filogeográficas podem ser encontrados em diferentes gêneros de bromélias (*Catopsis* – Kartzinel *et al.*, 2015; *Aechmea* – Goetze *et al.*, 2016; *Vriesea* – Zanella, 2013; *Dyckia* – Melo, 2016). No entanto, trabalhos com exclusivo enfoque filogeográfico contemplando a distribuição total das espécies ainda são escassos (Palma-Silva *et al.*, 2016; Castello *et al.*, 2020). Mais especificamente na Mata Atlântica, tais estudos foram realizados apenas com *Vriesea gigantea* Gaudich. (Palma-Silva *et al.*, 2009), e mais recentemente com espécies do complexo *V. incurvata* (Aguiar-Melo *et al.*, 2019; Neves *et al.*, 2019) e do complexo *Piticairnia flammea* (Mota, 2019).

A história evolutiva da Mata Atlântica é complexa, esse bioma parece ter sofrido grandes impactos com as mudanças climáticas do Pleistoceno, com expansão da floresta nos períodos interglaciais e retração nos períodos glaciais em zonas de estabilidade florestal (os refúgios) (Behling e Negrelle, 2001; Ledru *et al.*, 2005; Carnaval e Moritz, 2008; Batalha-Filho e Miyaki, 2011). Os padrões evolutivos observados em relação às porções norte e sul da floresta ainda são fonte de muito debate, com alguns estudos indicando estabilidade da porção norte durante as glaciações, e maior fragmentação da porção sul com a expansão da vegetação campestre (Carnaval e Moritz, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; D’Horta *et al.*, 2011), e outros indicando que a porção sul não foi tão severamente impactada, sugerindo áreas estáveis que serviram de refúgio para espécies de plantas e animais (Thomé *et al.*, 2010; Brunet *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2015; Bünger *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2018; Aguiar-Melo *et al.*, 2019). Além disso, em muitos trabalhos, foram identificadas regiões, ao longo da floresta, que estão envolvidas em quebras do fluxo gênico, gerando estruturação e diferenciação entre populações de animais e plantas (Pellegrino *et al.*, 2005; Palma-Silva *et al.*, 2009; Batalha-Filho *et al.*, 2010;

Ribeiro *et al.*, 2011b; Brunes *et al.*, 2015; Menezes *et al.*, 2016; Turchetto-Zolet *et al.*, 2016). Essas regiões proporcionam descontinuidades filogeográficas, e provavelmente são oriundas de vários eventos, como as mudanças climáticas do Pleistoceno, dinâmica geomorfológica e sistemas fluviais (Thomé *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011b; Menezes *et al.*, 2016). Neste sentido, quanto mais estudos com enfoque evolutivo nos mais variados organismos que habitam as diferentes porções desta floresta, maior será a clareza da história evolutiva deste bioma.

1.4 Barreiras reprodutivas e Hibridação em bromélias

O fluxo gênico é o movimento de genes de uma população para outra, podendo ocorrer dentro ou entre espécies (Slatkin, 1985; Ridley, 2007). O isolamento reprodutivo ocorre através da evolução de barreiras naturais que impedem ou reduzem o fluxo gênico entre grupos de populações, ocasionando o acúmulo de diferenças genéticas, podendo levar a especiação destes grupos (Rieseberg e Willis, 2007). As barreiras ao fluxo gênico entre espécies são classificadas de dois modos: redução da probabilidade de os gametas serem combinados para a formação de um zigoto viável (pré-zigótica), ou redução da viabilidade ou potencial reprodutivo de híbridos interespecíficos (pós-zigótica) (Tiffin *et al.*, 2001). Nas plantas, estas barreiras reprodutivas podem ser divididas em pré-polinização (mecanismos pré-zigóticos) e pós-polinização (mecanismos pré e pós-zigóticos) (Tiffin *et al.*, 2001; Baack *et al.*, 2015). As barreiras pré-polinização incluem o isolamento ecogeográfico, a diferenciação nos períodos de floração, assim como a especialização em diferentes polinizadores com a diferenciação de cores e traços florais (Rieseberg e Willis, 2007; Baack *et al.*, 2015). Os mecanismos pré-zigóticos na pós-polinização incluem a heteroespecificidade do pólen (interações polén-pistilo, polén-óvulo e tamanho do tubo polínico) que reduz a chance do óvulo ser alcançado em comparação com pólen conespecífico, impedindo ou reduzindo as taxas de germinação interespecíficas (Tiffin *et al.*, 2001; Baack *et al.*, 2015). Já os mecanismos pós-zigóticos incluem a inviabilidade, esterilidade do híbrido, e a falha ou redução da reprodução bem sucedida nas gerações seguintes, causado por incompatibilidades genéticas ou baixa aptidão em habitats das espécies parentais (Tiffin *et al.*, 2001; Rieseberg e Willis, 2007; Goodwillie e Ness, 2013). O isolamento reprodutivo, normalmente, envolve múltiplas fases de vida das plantas, e na

maioria dos casos, uma variedade de barreiras reprodutivas contribui para o isolamento total ou parcial (Rieseberg e Willis, 2007; Cozzolino e Scopece, 2008; Lowry *et al.*, 2008).

O estudo experimental das barreiras reprodutivas é de extrema importância para decifrar o papel do fluxo gênico interespecífico na especiação em Bromeliaceae (Palma-Silva *et al.*, 2016). Em um estudo realizado com 42 espécies de bromélias simpátricas da Estação Biológica Santa Lúcia (ES) na Mata Atlântica, foi observada uma variada sobreposição dos períodos de floração (de 26 a 62%) e o compartilhamento de visitantes florais (principalmente beija-flores) sugerindo a falta de barreiras pré-polinização (mecanismos pré-zigóticos) nestas espécies (Wendt *et al.*, 2008). Já em outro estudo, na mesma localidade, foi realizado o cruzamento e a análise de crescimento do tubo polínico em 13 espécies de bromélias (Matallana *et al.*, 2016). Os autores observaram a rejeição de pólen heteroespecífico em 73,5% dos casos, confirmando a existência de mecanismos pré-zigóticos (pós-polinização), contudo a penetração do óvulo foi observada nos outros 26,5%, sugerindo que os mecanismos pré-zigóticos (pós-polinização) podem também ser ineficientes e levar a formação de híbridos naturais. Apesar da formação de híbridos ser observada, a divergência dos sistemas de reprodução observada entre as espécies *V. scalaris* E.Morren. (predominantemente autocompatível) e *V. simplex* (hercogâmica) pode funcionar como uma barreira pré-zigótica (pré-polinização) permitindo a coexistência e a manutenção destas espécies quando em simpatria (Neri *et al.*, 2017a). Os mesmos autores também observaram uma baixa viabilidade das sementes F1 em cruzamentos artificiais, sugerindo a importância das barreiras pós-polinização (pós-zigóticas).

Uma vez que o isolamento reprodutivo entre espécies não esteja completo e haja permeabilidade das barreiras reprodutivas, a hibridação pode ocorrer (Lowry *et al.*, 2008). Diferentes consequências evolutivas podem ser observadas a partir do processo de hibridação, como a criação de novas linhagens, podendo ocorrer no mesmo nível de ploidia (homoploidia) ou pela duplicação do genoma (alopoliploidia), manutenção ou aumento da diversidade genética intraespecífica, origem e transferência de adaptações genéticas, reforço ou a quebra de barreiras reprodutivas, e mesmo a extinção de populações ou espécies (Rieseberg, 1997; Abbott *et al.*, 2013; Todesco *et al.*, 2016; Runemark *et al.*, 2019). A hibridação pode ocorrer em diferentes contextos espaciais e temporais, como por exemplo, contato secundário após um período de evolução independente (formação de

zonas híbridas em limites parapátricos abruptos) ou contato contínuo com seleção divergente (troca de genes entre populações localmente adaptadas), além de poder ocorrer em um complexo mosaico de habitats, combinando características de zonas híbridas com aquelas de adaptação local (Abbott *et al.*, 2013). Neste sentido, a perturbação do habitat, causada por ações antrópicas, é um dos fatores que ajudam a promover a hibridação entre espécies, proporcionando contato entre populações que até então estavam isoladas (Wiegand 1935; Lamont *et al.*, 2003; Gilman e Behm, 2011; Harrison e Larson, 2014).

Casos de hibridação natural já foram observados em diferentes gêneros de bromélias, como *Pticaoirnia* L'Hér. (Wendt *et al.* 2000; 2001), *Tillandsia* L. (Gardner, 1984; Gonçalves e Azevêdo-Gonçalves, 2009) *Puya* Molina (Schulte *et al.*, 2010) *Dyckia* Schult. & Schult.f. (Hirsch *et al.*, 2020) e *Vriesea*. (Matos *et al.*, 2016; Zanella *et al.*, 2016; Neri *et al.*, 2017b). Muitas vezes, espécies irmãs ocorrem na mesma região, compartilhando polinizadores (Wendt *et al.*, 2008; Matallana *et al.*, 2016), e, sendo Bromeliaceae um exemplo de radiação adaptativa recente (Givnish *et al.*, 2007; 2011), muitas linhagens ainda não estão completamente isoladas reprodutivamente, o que pode permitir a ocorrência de hibridação (Palma-Silva *et al.*, 2016).

1.5 Objetivos

A família Bromeliaceae abriga diversos complexos de espécies que divergiram recentemente e que ocupam biomas neotropicais que carecem de estudos para a melhor compreensão da sua história evolutiva. Nesse contexto, esta tese tem como objetivos gerais utilizar espécies do gênero *Vriesea* pertencentes ao grupo das infladas para melhor compreender o grau de isolamento reprodutivo entre elas, bem como colaborar com a compreensão dos padrões históricos envolvidos na diversificação das espécies e do bioma Mata Atlântica.

1.5.1 Objetivos Específicos

- Analisar os padrões de fluxo gênico e a história demográfica de *V. incurvata* ao longo de toda sua distribuição (região sul da Mata Atlântica) utilizando marcadores plastidiais e nucleares;

- Estimar o fluxo gênico interespecífico, bem como a estruturação populacional através de marcadores nucleares do tipo microssatélite entre espécies simpátricas em três localidades da Mata Atlântica: Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia-SP (*V. carinata*; *V. taritubensis* var. *patens*; *V. simplex* e *V. agostiniana*); Estação Biológica da Boraceia - SP (*V. inflata* e *V. incurvata*); e Estrada Dona Francisca em Joinville – SC (*V. carinata* e *V. incurvata*);
- Analisar características morfológicas das espécies para identificar as diferenças entre estas dentro de cada localidade, assim como para com os supostos híbridos;
- Inferir o quanto as barreiras reprodutivas estão sendo eficientes entre as espécies de *Vriesea* do grupo das infladas nas localidades analisadas.

CAPÍTULO II

Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest

(Publicado na revista American Journal of Botany)

Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest

Camila Aguiar-Melo^{1,*}, Camila M. Zanella^{1,2,*}, Márcia Goetze¹, Clarisse Palma-Silva³, Luiza D. Hirsch¹, Beatriz Neves⁴, Andrea F. da Costa⁴, and Fernanda Bered^{1,5} 

Manuscript received 10 January 2019; revision accepted 18 April 2019.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Avenida Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

² National Institute of Agricultural Botany (NIAB), Huntingdon Road, CB30LE, Cambridge, UK

³ Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862, Campinas, SP, Brazil

⁴ Departamento de Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁵ Author for correspondence (e-mail: fernanda.bered@ufrgs.br)

* These authors contributed equally to this work.

Citation: Aguiar-Melo, C., C. M. Zanella, M. Goetze, C. Palma-Silva, L. D. Hirsch, B. Neves, A. F. da Costa, and F. Bered. 2019. Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest. *American Journal of Botany* 106(7): 971–983.

doi:10.1002/ajb2.1317

PREMISE: Despite the efforts to understand the processes that shape neotropical biodiversity, the complexity of certain biomes, such as the Atlantic Forest (AF), prevents the generalization of patterns. Initially, ecological niche modeling (ENM), with phylogeographic studies, identified past stable areas in the central and northern portions of the AF, while the southern portion was thought to be highly fragmented. Here, we examined the phylogeography, historical patterns, genetic diversity, and population structure of *Vriesea incurvata*, an endemic species of the southern portion of the AF.

METHODS: We evaluated 149 individuals using two plastid DNA regions (cpDNA) and 13 nuclear microsatellite markers (nuSSRs) to access the historical patterns, genetic diversity, and structure of *V. incurvata* populations. We also conducted historical demography and ENM analyses.

RESULTS: We found moderate to high genetic diversity and low population structure for both genomes. The cpDNA network revealed high haplotype sharing. The ENM suggested no drastic changes in suitable areas for *V. incurvata* occurrence, corroborating the finding of no phylogeographic structure.

CONCLUSIONS: Contrary to some studies, our results indicate that the southern AF was a historically stable climate region for *V. incurvata* occupation after southward colonization by the species. Past climatic changes probably did not cause structuring among its populations.

KEY WORDS Bromeliaceae; cpDNA; genetic diversity; historical patterns; neotropics; nuSSR; phylogeography; *Vriesea*.

The Atlantic Forest (AF) covers the eastern slopes of a huge mountain chain along the coastline from southern to northeastern Brazil, is the third largest biodiversity hotspot of the world, with approximately 20,000 plant species, of which 8000 are endemic (Morellato and Haddad, 2000; Myers et al., 2000; Ribeiro et al., 2011). It holds a considerable proportion of South America's biodiversity, but, currently, only 7.5% of its primary vegetation remains, and it continues to suffer from significant anthropogenic impacts (Myers et al., 2000; Ribeiro et al., 2009). The increasing fragmentation of the AF has propelled research and proposals to mitigate the effects of devastation (Morellato and Haddad, 2000). However, the design of efficient strategies requires knowledge of current biodiversity patterns and, more importantly, a better understanding of its evolutionary

history (Álvarez-Presas et al., 2014). Much effort has been put into understanding the complex and high levels of biodiversity in the AF through phylogeographic, biogeographic, and paleomodelling studies, which may provide valuable insights into the historical processes underlying diversification in this region (Martins, 2011; Turchetto-Zolet et al., 2013; Leal et al., 2016; Antonelli et al., 2018; Pinheiro et al., 2018). Nevertheless, neotropical biodiversity data present numerous uncertainties, which hamper the generalization of patterns (Antonelli et al., 2018). Thus, further contributions in the area of phylogeography and biogeography of AF organisms are very important to fill this gap.

Palynological and paleodistribution modeling studies have suggested that AF was severely affected by climate changes during

the Pleistocene (Behling and Negrelle, 2001; Ledru et al., 2005; Carnaval and Moritz, 2008), which makes this a suitable region for studying the phylogeography of species endemic to this region (Cabanne et al., 2016). Initially, ecological niche models, together with phylogeographic studies, identified favorable environments for the occurrence of different species (stable forest areas) that seem to be important drivers of biodiversity in the northern portion of AF, whereas the southern portion of the forest would have been heavily fragmented by the spread of grassland vegetation (Carnaval and Moritz, 2008; Carnaval et al., 2009; Martins et al., 2009; Palma-Silva et al., 2009; d'Horta et al., 2011). However, further studies proposed that, during glaciations, the southern portion of the AF was not as severely impacted as previously suggested (Thomé et al., 2010; Brunes et al., 2015; Peres et al., 2015; Bünger et al., 2016; Cabanne et al., 2016; Costa et al., 2018). Therefore, the distinct patterns recovered for the southern and northern portions of the AF are still a subject of debate. In this sense, studies on taxa restricted to each region may be important to unveil the specific diversification dynamics found in each area and consequently develop a more complete scenario of processes responsible for the biodiversity of the biome as a whole.

The Bromeliaceae, comprising 3590 species and 75 genera, is one of the most morphologically and ecologically diverse of the flowering plant families native to the tropics and subtropics of the New World (Gouda et al., 2019). These taxa have an incredible diversity of adaptations and have been able to fill numerous niches (Givnish et al., 2011; Zanella et al., 2012). Phylogeographic studies on bromeliad species have been important in elucidating evolutionary processes in different biomes, such as the Caatinga, Cerrado, and AF (Palma-Silva et al., 2009; Goetze et al., 2016, 2018; Gonçalves-Oliveira et al., 2017; Leal et al., 2018). *Vriesea* Lindl. (subfamily Tillandsioideae) is one of the most diverse genera in the Bromeliaceae, with 226 species described (Costa et al., 2015; Gouda et al., 2019). Approximately 74% of all *Vriesea* species occur in the AF, the main diversity center of the genus (Costa et al., 2015), and are very representative of this biome.

The *Vriesea incurvata* complex is a monophyletic group distributed in the AF between approximately 22°S and 29°S (Rio Grande do Sul to Rio de Janeiro Brazilian States); it includes the morphologically similar species *V. incurvata* Gaudich, *V. sucrei* L.B.Sm. and Read, and *V. taritubensis* E.Pereira I.A.Penna (with three varieties) (Neves et al., 2018). *Vriesea incurvata* was first described as occurring throughout the distribution area of the entire complex (Smith and Downs, 1977; Martinelli et al., 2008), but a recent taxonomic study indicated that populations farther north (north São Paulo and Rio de Janeiro Brazilian states) are in fact a different taxon assigned as *V. taritubensis* (Neves et al., 2018). B. Neves et al. (unpublished manuscript) concluded, based on analyses of chloroplast regions, that *V. taritubensis* and *V. incurvata* likely diverged approximately 4.5 Ma (millions of years ago) during the late Quaternary (Pliocene) period and started to diversify in the region of the Bocaina Mountain range (22°68'S; 44°31'W) toward both extremities of AF, with *V. incurvata* colonizing strictly the southern portion of the forest.

The aim of the present study was to examine the phylogeographic and demographic historical patterns and the genetic diversity of *V. incurvata*, endemic to the southern portion of AF. Specifically, we addressed the following questions: (1) What are the patterns of gene flow and the historical demography for this species? (2) Are the observed patterns consistent with other

studied taxa from the AF? (3) How is the genetic diversity of *V. incurvata* distributed across the AF? (4) Is there population structure in this species? If yes, what are the patterns? The results will be discussed in the context of both historical and contemporary gene flow.

MATERIALS AND METHODS

Study species

Vriesea incurvata is an epiphytic plant with simple inflorescences with red floral bracts and yellow flowers (Martinelli, 1994; Neves et al., 2018). Anthesis is diurnal, it blooms all year, with peak flowering from January to March (Machado and Semir, 2006; Neves et al., 2018). It is self-compatible with high fruiting success in flowers from cross-pollination (Martinelli, 1994). *Vriesea incurvata* inhabits humid places near waterfalls and streams, and the color of the flower bracts is the most important attractant for its pollinators, such as the hummingbird *Phaethornis eurynome* Lesson (Martinelli, 1994; Machado and Semir, 2006; Neves et al., 2018). The seeds have plumose appendages, which facilitate long-distance dispersal (Smith and Downs, 1977; Magalhães and Mariath, 2012).

Population sampling and DNA isolation

A total of 149 individuals of *V. incurvata* were sampled in nine localities across most of the species' geographic distribution corresponding to the south portion of the AF (Fig. 1A). The specifications and identification codes of each locality and the number of individuals collected from each site are summarized in Table 1. The voucher specifications are presented in Appendix 1. Fresh leaves were collected and stored in silica gel for drying, and total genomic DNA was isolated using the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle and Doyle, 1990).

Molecular markers, sequencing, and genotyping

We used plastid DNA regions (cpDNA) and nuclear simple sequence repeats (nuSSRs) to investigate genetic diversity and population structure of *V. incurvata*. Two cpDNA regions, the *trnL-trnF* spacer and the *matK* gene, were chosen based on the extent of their polymorphism and were amplified and sequenced from 52 individuals from all nine localities sampled (Table 2). Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing strategies for *trnL-trnF* and *matK* followed the protocol of Zanella et al. (2016). PCR amplifications were performed in a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the products were sequenced from both ends using the BigDye Kit (Applied Biosystems) at Macrogen Inc. (South Korea). All sequences were visually checked in the Chromas 2.33 sequence viewer (Chromas Technelysium, South Brisbane, Australia) and edited to obtain the consensus sequence using the tool Muscle (Edgar, 2004) implemented in MEGA version 5.2 (Tamura et al., 2011). *Vriesea incurvata* sequences generated in this study were deposited in GenBank (accessions KT346053 to KT346104 for *trnL-trnF*, KT346177 to KT346228 for *matK*). Polymorphisms at mononucleotide microsatellites were excluded due to ambiguous alignment and higher mutation rates. For statistical analyses, the sequences of the two plastid regions were concatenated.

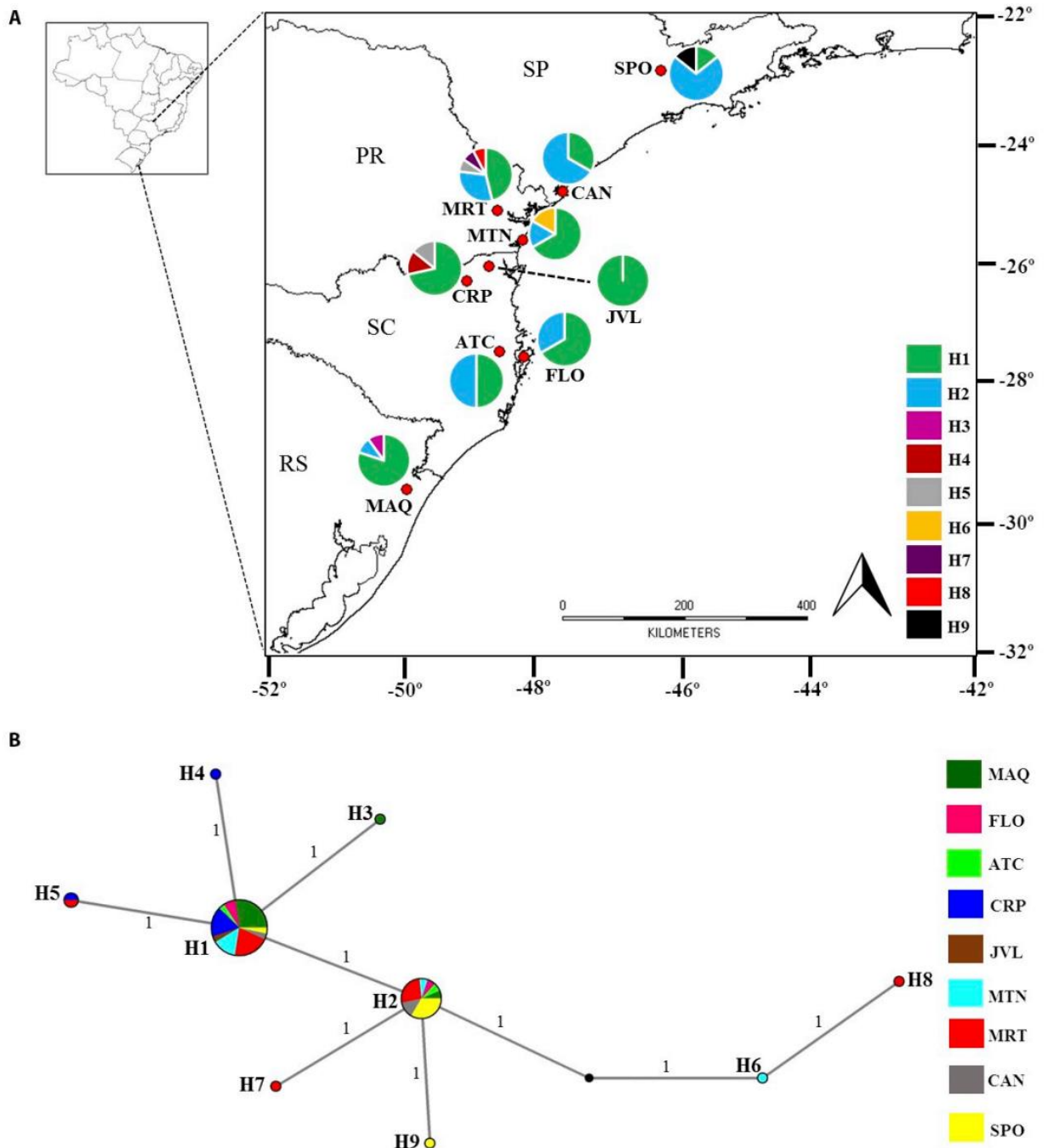


FIGURE 1. (A) Geographic distribution of nine haplotypes recovered from cpDNA (*matK* + *trnL-trnF*) and identified in nine *Vriesea incurvata* localities sampled in the Atlantic Forest. (B) Median-joining network showing the genealogical relationship for nine cpDNA haplotypes identified in *V. incurvata*. Each circle represents one haplotype, with diameter proportional to frequency and colors representing localities with the haplotype (see key on right for locality abbreviations, which are defined in Table 1).

TABLE 1. Sampling sites of *Vriesea incurvata* in the Atlantic Forest with identification codes and specification, number of individuals collected (*N*), geographical coordinates and voucher information.

Locality/State	CODE	Site	<i>N</i>	Lat S	Long W	Voucher
Maquiné/RS	MAQ	Garapiá Waterfall	30	29°30'	50°14'	R219322
Florianópolis/SC	FLO	UCAD	18	27°31'	48°30'	R219265
Antônio Carlos/SC	ATC	RPPN Caraguatá	16	27°27'	48°51'	FLOR 22616
Corupá/SC	CRP	RPPN Emilio Battistella	16	26°24'	49°20'	R219324
Joinville/SC	JVL	Serra Dona Francisca	1	26°10'	48°59'	R219335
Matinhos/PR	MTN	Parque Estadual Rio da Onça	14	25°47'	48°31'	R219338
Morretes/PR	MRT	Parque Estadual Pico do Marumbi and Serra da Graciosa	40	25°20'	48°52'	R219267
Cananéia/SP	CAN	Parque Estadual Ilha do Cardoso	3	25°04'	47°55'	R219391
São Paulo/SP	SPO	Rodoanel	11	23°27'	46°47'	SP430361
Total			149			

Notes: States—RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná; SP, São Paulo. Codes for reserves—RPPN, Reserva Natural do Patrimônio Natural; UCAD, Unidade de Conservação Ambiental Desterro.

TABLE 2. The estimated diversity indexes for plastid DNA (cpDNA = *matK* + *trnL-trnF*) and 13 nuclear microsatellites (nuSSR) of *Vriesea incurvata*. Sample size analyzed for both genomes (*N*), haplotype diversity (*h*), nucleotide diversity (π), number of haplotypes (*NH*), number of alleles (*A*), private alleles (*PA*), allelic richness (*AR*), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities and inbreeding coefficient (F_{is}). For locality abbreviation names, see Table 1.

Locality	cpDNA				nuSSR						
	<i>N</i>	<i>h</i>	π	<i>NH</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>PA</i>	<i>AR</i>	H_o	H_e	F_{is}^a
MAQ	10	0.378	0.0001	3	29	75	2	2.40	0.519	0.623	0.170*
FLO	3	0.667	0.0002	2	17	64	5	2.31	0.267	0.554	0.531*
ATC	2	1.000	0.0004	2	16	71	2	2.49	0.390	0.629	0.392*
CRP	7	0.524	0.0002	3	16	79	4	2.55	0.595	0.649	0.086
JVL	1	1.000	0.0000	1	—	—	—	—	—	—	—
MTN	6	0.600	0.0004	3	12	70	2	2.59	0.357	0.670	0.479*
MRT	13	0.731	0.0005	5	39	111	15	2.57	0.476	0.654	0.274*
CAN	3	0.667	0.0002	2	—	—	—	—	—	—	—
SPO	7	0.524	0.0002	3	11	75	7	2.64	0.467	0.678	0.321*
TOTAL	52	0.614	0.0003	9	140	146	—	11.06	0.466	0.679	—

Inbreeding coefficient (F_{is}) departed significantly from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) at * $P < 0.001$.

We analyzed 13 nuSSRs from 140 individuals from seven localities of *V. incurvata* (Table 2). Two of the localities sampled for cpDNA could not be considered because the number of plants found was insufficient for the population analyses. The 13 SSR loci were isolated from *Vriesea gigantea* Gaudich. (*VgA04*, *VgB10*, *VgB12*, *VgC01*, *VgG02*, and *VgG03*; Palma-Silva et al., 2007), *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (*Ai5.18*, *Ai4.10*, and *Ai4.03*; Palma-Silva et al., 2007), *Tillandsia fasciculata* Sw. (*e6*, *p2p19*, and *e6b*; Boneh et al., 2003) and *Pitcairnia albiflos* Herbert (*PaA10*; Paggi et al., 2008). For each nuSSR, the forward primers were synthesized with a 19-bp M13 tail (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') at the 5' end to allow for labeling with a tailed fluorescent dye M13 primer during genotyping procedures, following the method of Schuelke (2000). All PCR amplifications were performed in the Veriti 96-Well Thermal Cycler following the protocol of Palma-Silva et al. (2007). The microsatellite alleles were resolved on an ABI 3100 DNA Analyzer Sequencer (Applied Biosystems) and sized against the GS500 LIZ molecular size standard (Applied Biosystems) using GeneMarker Demo version 1.97 (SoftGenetics, State College, PA, USA).

Data analysis

Genetic diversity—For the cpDNA, we estimated haplotype (*h*) and nucleotide (π) diversity (Nei, 1987), number of haplotypes, and

the GC content for each population using the software Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005). For nuSSR, diversity was characterized for each locality using the number of alleles (*A*), private alleles (*PA*), allelic richness (*AR*), observed (H_o) heterozygosity, expected (H_e) heterozygosity, and inbreeding coefficient (F_{is}) (Weir and Cockerham, 1984), calculated using the programs Arlequin, FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 1995), and MSA 4.05 (Dieringer and Schlötterer, 2003). Departures from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for each locality were identified using exact tests in GENEPOP 4.2 (Raymond and Rousset, 1995; Rousset, 2008) with 10,000 permutations.

Genetic structure and gene flow—For cpDNA, genealogical relationships among haplotypes were inferred using the median-joining method (Bandelt et al., 1999), implemented in the software Network 4.6.1.6 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Estimates of differentiation (G_{ST} and F_{ST} statistics) were calculated in the software DnaSp v5.10.01 (Librado and Rozas, 2009), taking into account the pairwise distance between cpDNA haplotypes but excluding locality JVL because it has only one individual and, consequently, one haplotype was identified. Pairwise comparisons of genetic distance (Φ_{ST}) among localities that presented more than one haplotype were estimated in Arlequin with 10,000 permutations. We also carried out an analysis of molecular variance (AMOVA) to examine the partition of plastid genetic

diversity within and among localities using Arlequin with 10,000 permutations.

For nuSSR, we assessed nuclear genetic differentiation using estimates of F_{ST} (Weir and Cockerham, 1984), the unbiased estimator of relative differentiation G_{ST} (Nei and Chesser, 1983), and the standardized genetic differentiation measure G'_{ST} (Hedrick, 2005) calculated using FSTAT. Pairwise comparisons of F_{ST} between localities were estimated with 10,000 permutations for each of the seven localities using the software Arlequin. AMOVA was carried out to examine the partition of nuclear genetic diversity within and among localities in Arlequin with 10,000 permutations. To investigate the occurrence of population structure, we performed a Bayesian clustering algorithm implemented in STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). For each K (from 1 to 10), we performed 10 replicates, using the admixture model, assuming independent allele frequencies and using a burn-in period of 500,000 and a run length of 1,000,000 to confirm the stabilization of summary statistics (Pritchard et al., 2000). We determined the most likely number of populations, K , by using the method ΔK described by Evanno et al. (2005), implemented in Structure Harvester 0.6.94 (Earl and vonHoldt, 2012). We also estimated the optimal number of clusters using the silhouette method of the PAM algorithm using the factoextra package in R version 3.5.1 (R Core Team, 2018). We did a discriminant analysis of principal components (DAPC) (Jombart et al., 2010) implemented in the R package adegenet version 2.1.0 (Jombart, 2008; Jombart and Ahmed, 2011) to identify population structure.

To estimate the relative contribution of pollen versus seed flow to total gene flow, we compared G_{ST} values from biparentally inherited nuSSRs with those from uniparentally inherited plastid markers according to the equation proposed by Petit et al. (2005).

The hypothesis that individuals from each locality are differentiated due to isolation by distance was tested by calculating the correlation between geographic and genetic distance matrices (F_{ST}) with a standardized Mantel test using GENETPOP. The significance was assessed through a randomization test using 10,000 Monte Carlo simulations. Pairwise effective migration rates ($N_e m$) were estimated among localities, following a coalescent theory and maximum-likelihood-based approach using Migrate 3.0.3 software (Beerl and Felsenstein, 1999). The computations were carried out under a Brownian motion model, and mutation rates (μ) among the loci were estimated from the data.

Demographic analyses—For cpDNA data, neutrality tests were performed using Tajima's D (Tajima, 1989), considering the segregating sites and Fu's F_s (Fu, 1997), based on the haplotype distribution for all localities with the exception of JVL (only included in the total of individuals). Tests were carried out with 10,000 simulation steps using Arlequin, considering all individuals in the eight localities with more than one haplotype. Bayesian skyline plot (BSP) analysis (Drummond et al., 2005) was carried out for the total number of individuals ($n = 52$) using Beast version 1.7.5 (Drummond et al., 2012) with the following prior conditions: lognormal relaxed clock (uncorrelated), with a substitution rate previously estimated for cpDNA in the subfamily Bromelioideae (cpDNA: $7.64 \times 10^{-4} \pm 4.5 \times 10^{-6}$; D. Silvestro, University of Gothenburg, personal communication). The HKY + I nucleotide substitution model was used. Substitution models were selected based on the Akaike information criterion (AIC) implemented in the program jModelTest 2.1.3 (Darriba et al., 2012). Markov chains were run for 50,000,000 steps,

with sampling performed every 1000 steps. The BSP computation and convergence checks were completed in the program Tracer 1.6 (available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). An effective sample size (ESS) of more than 200 was used as a threshold (Drummond and Rambaut, 2007).

For nuSSR data, a heterozygosity excess test was used to test for genetic bottlenecks using the software BOTTLENECK 1.2.02 (Piry et al., 1999) and the parameters described by Goetze et al. (2018).

Time of divergence—The time of the cpDNA haplotype divergence was estimated using a Bayesian approach implemented in the software Beast, using *Alcantarea imperialis* (GenBank accession AY614032.1 [*matK*] and AY614276.1 [*trnL-trnF*]) and *Catopsis junceifolia* Mez and Wercklé (GenBank accession AY614027.1 [*matK*] and AY614271.1 [*trnL-trnF*]) as an outgroup. Priors used included the birth–death speciation model and the lognormal relaxed clock (uncorrelated). The same substitution rate and substitution model was used as in the BSP analysis (see above). Markov chains were run for 30,000,000 steps, with sampling done every 1000 steps. The results were viewed in Tracer to check for convergence to a stationary distribution and for an ESS of more than 200 (Drummond and Rambaut, 2007). TreeAnnotator 1.7.5, part of the Beast software package, was used to summarize the trees, and the statistical support for all branches was measured as Bayesian posterior probability (PP). The software FigTree 1.4.2 was used to draw the tree (Rambaut, 2014).

Ecological niche modeling—To infer suitable regions of *V. incurvata* in the late Quaternary period, we carried out ecological niche modeling (ENM) for current species distribution under two time periods (mid-Holocene [MH]) at 6000 years before the present (yBP) and Last Glacial Maximum (LGM; at 21,000 yBP), using a model of maximum entropy implemented in Maxent 3.4.1 (Phillips et al., 2006). We employed all of the collection sites georeferenced by Neves et al. (2018) using herbarium records and existing databases (i.e., GBIF, SpeciesLink, and Jabot). We removed double records and localities nearby, resulting in 64 records that matched the species distribution (Appendix S1). Of these, eight records (except for the SPO) correspond to the populations of this study.

The distribution models were developed using a set of 19 bioclimatic RASTER layers, with a 2.5-arc-min resolution (4.5 km at the equator) (Hijmans et al., 2005) derived from the CCSM4 (Community Climate System Model maintained by National Center for Atmospheric Research, USA) general circulation model (GCM). The RASTER layers for present and past climatic periods are hosted by the WorldClim website version 1.4 (Hijmans et al., 2005). The grid layers were cut to include most of the area of AF and the entire geographical distribution for *V. incurvata* and extracted through the RASTER package (Hijmans, 2017) implemented in R. We first ran the analysis in Maxent with all of its bioclimatic variables (19). Pearson's correlation between the variables was calculated using the RASTER package. We selected bioclimatic variables with low correlation ($R \leq 0.75$) and that presented a high percentage of importance to the model in a preliminary run (Nakazato et al., 2010; Segatto et al., 2017). We used cross-validation to evaluate the species' distribution model, using 10 replicates. All other parameters were set to the default settings. Cross-validation modeling is recommended for small data sets, as in the case of *V. incurvata* (Phillips, 2017). To analyze the models, we checked the area under the receiver operating characteristic curve (AUC) in Maxent

results, indicating one reasonably well performance of above 0.95 (Nakazato et al., 2010). The final figures were edited in QGIS 3.2.1 Bonn (Qgis Development Team, 2018).

RESULTS

Genetic diversity

The two regions of cpDNA were concatenated, resulting in a length of 2716 bp and GC content of 32.65%. Seven polymorphic sites were observed (four transitions, two transversions, and one indel), leading to nine haplotypes for the 52 analyzed individuals. The haplotype diversity ranged from 0.378 to 1.000, while nucleotide diversity varied from 0.0001 to 0.0005 (Table 2). The number of haplotypes varied from one to five per locality sampled (Table 2).

The 13 nuSSR markers were polymorphic in the samples from seven localities evaluated and included a total of 146 alleles (Table 2). The number of alleles ranged from 64 (FLO) to 111 (MRT) in each locality. Allelic richness varied from 2.31 (FLO) to 2.64 (SPO). Three localities had two private alleles each (MQN, ATC, and MTN). Localities FLO, CRP, and SPO had five, four, and seven private alleles, respectively, and MRT had 15 (Table 2). The observed and expected heterozygosities per locality ranged from 0.267 to 0.595 and from 0.554 to 0.678, respectively (Table 2). Inbreeding coefficients (F_{IS}) departed significantly from HWE for all the localities analyzed, except for CRP (Table 2).

Population structure and gene flow

The cpDNA network revealed nine haplotypes separated from each other by one mutational step, except for two steps from H2 to H6 (Fig. 1B). The two most frequent haplotypes, H1 and H2, were shared among almost all localities along the geographic distribution of *V. incurvata* (Fig. 1A). Haplotype H5 was shared between CRP and MRT. The locality MRT showed two private haplotypes (H7 and H8). Haplotypes H3, H4, H6, and H9 appeared exclusively in MAQ, CRP, MTN, and SPO, respectively. The genetic differentiation results from the cpDNA were $F_{ST} = 0.017$ and $G_{ST} = 0.052$. The pairwise Φ_{ST} estimates were low or nonsignificant between most localities, except between MAQ, CRP, and MTN when compared with SPO ($P > 0.05$) (Appendix S2). AMOVA revealed that most of the genetic variation at cpDNA was within localities (92.25%) and the F_{ST} was 0.078 and nonsignificant ($P = 0.118$) (Table 3).

The genetic differentiation results from the nuSSR were $F_{ST} = 0.051$, $G_{ST} = 0.050$, and $G_{ST}^* = 0.058$, suggesting low genetic structure. AMOVA revealed more variation within localities (95.24%)

TABLE 3. Analyses of molecular variance (AMOVA) based on cpDNA (*matK* + *trnL-trnF*) and 13 nuclear microsatellites (nuSSRs).

Source of variation	Percentage of variation	F_{ST}
cpDNA		
Among localities	7.75	0.078
Within localities	92.25	
nuSSR		
Among localities	4.76	0.048*
Within localities	95.24	

Notes: F_{ST} , fixation index; * $P < 0.001$.

than among them (4.76%): $F_{ST} = 0.048$ and was significant ($P < 0.001$) (Table 3). The Evanno method based on structure analyses indicated that two is the most likely number of clusters, corroborating PAM algorithm analysis (Appendix S3). In general, the sampled localities showed a high degree of admixture, with the exception of MAQ (cluster 2) and MTN/SPO (cluster 1) (Fig. 2). The DAPC analysis corroborated the genetic groups found by Bayesian analysis but with a clearer structuring and identified three genetic groups (Fig. 3). The pairwise F_{ST} estimates varied from 0.004 (between MAQ and CRP and between CRP and MRT) to 0.112 (between SPO and FLO), with most of the comparisons being highly significant ($P < 0.001$) (Appendix S2). As expected, due to the similar values of G_{ST} between the markers, the ratio of pollen flow to seed flow estimated according to Petit et al. (2005) was close to zero (−0.66). The Mantel test results indicated isolation by distance among localities ($r^2 = 0.3021$; $P < 0.05$). Additionally, the maximum-likelihood-based estimates of effective migration rates ($N_e m$) were high, ranging from 0.506 (MAQ to SPO) to 3.964 (MRT to MTN) (Appendix S4).

Demographic history

For cpDNA, the results for Tajima's D and Fu's F_s were not significant for any of the localities tested, suggesting demographic stability (Appendix S5). However, when all individuals were considered, Fu's F_s indicated population expansion. The BSP analyses indicated a slight reduction in population size, followed by a more recent expansion (around 0.1 Ma), although this result should be interpreted with caution because the size of the estimated confidence limits does not indicate statistical significance (Appendix S6). BOTTLENECK analyses with nuSSRs did not detect a significant excess of heterozygosity; therefore, no reductions in population sizes through time were found (data not shown).

Haplotype divergence time

The divergence of the cpDNA haplotypes of *V. incurvata* started at approximately 2.04 Ma (95% highest posterior density: 0.49–5.73 Ma), in the early Pleistocene, but most of the actual haplotypes diversified in the last 1 Ma (Fig. 4).

Ecological niche modeling

The AUC values indicated a good predictive model performance of 0.985 for all analyzed periods (present, MH, and LGM). The most important bioclimatic variables with a lower correlation between them were minimum temperature of coldest month, mean temperature of warmest quarter, annual precipitation, precipitation of driest month, precipitation seasonality (coefficient of variation), and precipitation of coldest quarter. The respective percentages of contribution of these bioclimatic variables for each period (present, MH, and LGM), according to the Maxent results, are presented in Appendix S7. The species' known distribution ranges in the AF (from approximately 23°S to 29°S from SP to RS of the Brazilian Federative States; Fig. 5A) coincide with the most suitable areas for the present time (Fig. 5B). During the MH (Fig. 5C), the suitable areas were very similar to those observed in the present period, as the climate was probably similar. The suitable areas predicted for *V. incurvata* were slightly larger under the LGM conditions (Fig. 5D), when sea levels were lower as compared with during the other two periods. Interestingly, the LGM distribution model revealed some points of suitable areas where no records of

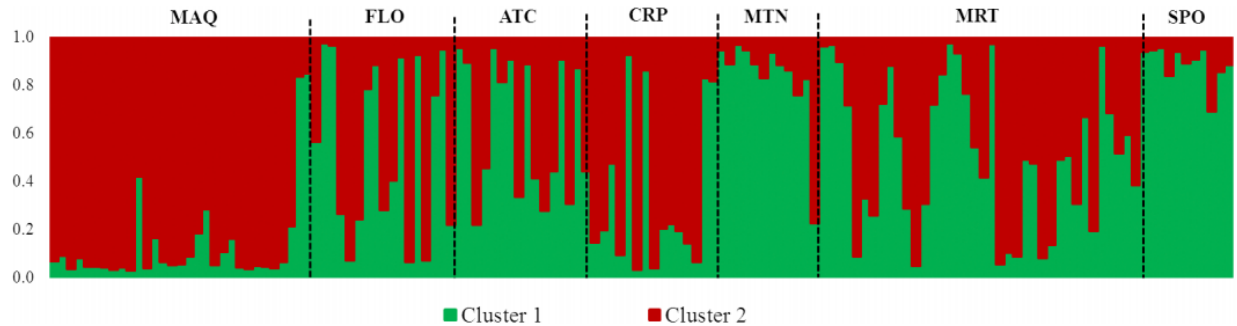


FIGURE 2. Population structure in *Vriesea incurvata* using Bayesian assignment analysis for a $K = 2$ population model based on 13 nuSSR loci. Cluster 1 corresponds to southeast populations and cluster 2 to southern populations. For locality abbreviation names, see Table 1.

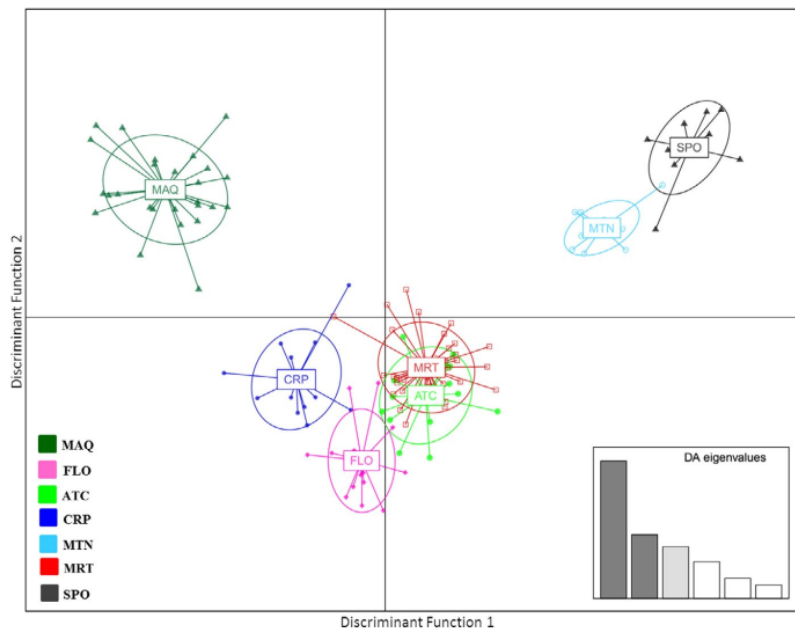


FIGURE 3. Discriminant analysis using principal components (DAPC) of the multilocus microsatellite genotypes of seven localities sampled for *Vriesea incurvata*; each locality is coded in a different color. For locality abbreviation names, see Table 1.

V. incurvata exist, such as in the west of Paraná Brazilian State, near Paraguay. The same was observed for the present and MH times.

DISCUSSION

Stability of the southern portion of the Atlantic Forest and lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata*

The ancestor of the core tillandsioid lineages, from which the genus *Vriesea* derives, probably arose in the Andes approximately 14.2 Ma. After that, the modern genera started to diverge from each other at approximately 8.7 Ma, expanding to Central America, the northern littoral area of South America, and the Caribbean (Givnish et al.,

2011). The expansion and diversification of the *Vriesea* lineages throughout eastern South America are evident, as the species are distributed in almost every ecosystem in the AF, with high rates of endemism (Martinelli et al., 2008; Costa et al., 2014). Currently, the *V. incurvata* complex is abundant and widely distributed throughout the southeastern and southern AF (Neves et al., 2018), with *V. incurvata* colonizing the southern portion of the AF after the divergence from *V. taritubensis* in the Pliocene (B. Neves et al., unpublished manuscript). In the present study, we evaluated the phylogeographic patterns of *V. incurvata* as a contribution to telling the history of the southern AF. The northern and southern parts of the AF have been identified as two distinct bioclimatic domains (Prance, 1982; Carnaval et al., 2014), and phylogeographic studies with different species, support this proposal (Cabanne et al., 2013; Brunes et al., 2015; Leite et al., 2016). Contradicting the intense instability attributed to the southern portion of the AF, the results of our ENM for *V. incurvata* suggested that the area potentially occupied by this species remained similar in the evaluated periods, which may be related to climate stability (Fig. 5). The most suitable areas during the LGM occurred in the south and southeast of Brazil, mainly from 23°S to 27°S from the Santa Catarina to São Paulo states (Fig. 5D), making evident that the appropriate ranges for *V. incurvata* occupation in the continental shelf during the LGM are now submersed, as similarly observed in other studies (Pinheiro et al., 2011; Thode et al., 2014; Leite et al., 2016; Segatto et al., 2017). Our *V. incurvata* results for MH showed that the suitable areas are very similar to those observed in the present (Fig. 5B, C), suggesting, when we analyzed the *V. incurvata* data, that the southern portion of the AF probably was a stable region.

The Bayesian phylogenetic tree results indicate that diversification of the *V. incurvata* haplotypes started in the late Pliocene/early Pleistocene ca. 2.04 Ma (Fig. 4). In addition to this recent diversification, the results show a lack of phylogeographic structure. The network from cpDNA showed high haplotype-sharing between

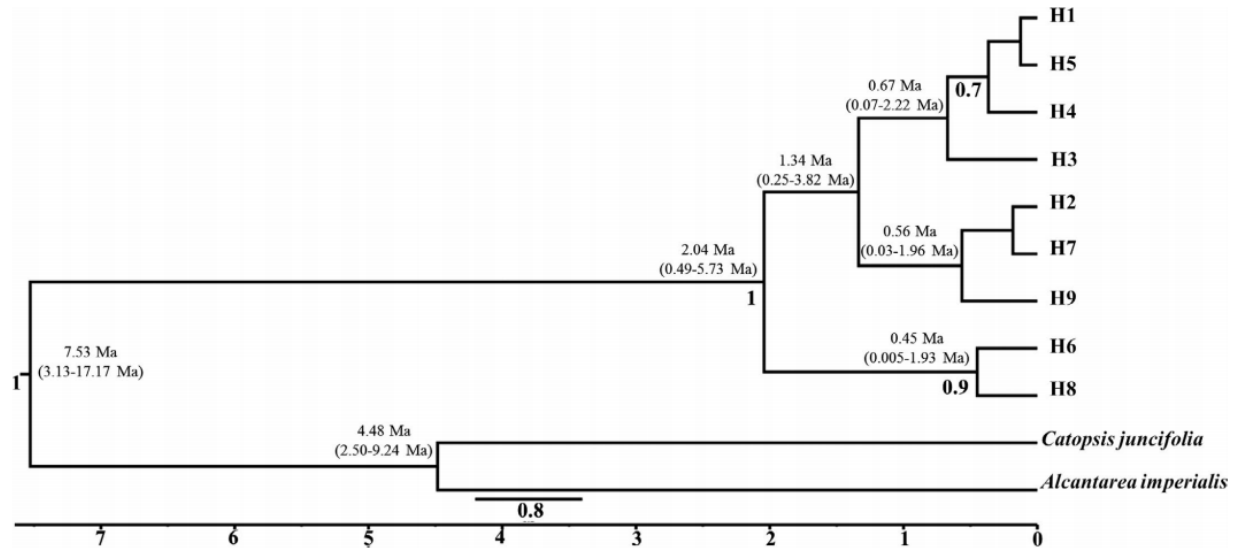


FIGURE 4. Bayesian phylogenetic tree of cpDNA (*matK* + *trnL-trnF*) haplotypes with posterior probabilities (>0.7) shown below the branches, and ages indicated for selected nodes. The time scale is in millions of years ago (Ma).

localities (Fig. 1A, B) even for geographically distant locations (Fig. 1A). Additionally, the AMOVA based on the cpDNA indicated that the highest percentage of genetic variation was observed within localities (92.25%), and the estimated F_{ST} was 0.078 and not significant (Table 3). This result corroborates the lack of phylogeographic structure found and the low F_{ST} and G_{ST} values (0.017 and 0.052, respectively). Most of the pairwise Φ_{ST} estimates were also low and not significant (Appendix S2). Moreover, we found moderate to high genetic diversity of cpDNA, mainly in samples located from 25°S to 27°S, from Paraná to the north of the Santa Catarina states (MTN, MRT, CRP) (Table 2; Fig. 1A). Goetze et al. (2017) also reported that populations of *Aechmea* Ruiz and Pav. (Bromeliaceae) species from the same region harbor the greatest number of haplotypes. Except for birds (Batalha-Filho et al., 2012; Cabanne et al., 2013), few studies on AF organisms suggest a lack of or weak phylogeographic structure. Instead, phylogeographic breaks and, consequently, the formation of structured groups have been reported for a number of organisms, including amphibians (Brunes et al., 2015; Menezes et al., 2016), bees (Batalha-Filho et al., 2010), reptiles (Pellegrino et al., 2005), bats (Martins et al., 2009), and plants (Ribeiro et al., 2011; Turchetto-Zolet et al., 2016). The causes of such breaks have been widely debated and attributed mainly to Pleistocene climatic cycles, geomorphological dynamics, and river systems (Thomé et al., 2010; Ribeiro et al., 2011; Menezes et al., 2016). Most of the phylogeographic studies of the AF biota show recurrent breaks; however, such breaks can be variable according to the region, the species, and its single characteristics (Cabanne et al., 2008; Carnaval et al., 2009; Palma-Silva et al., 2009; Thomé et al., 2010; D’Horta et al., 2011; Batalha-Filho, 2012; Turchetto-Zolet et al., 2013, 2016). Unlike in most studies, we did not find genetic structuring throughout the *V. incurvata* geographic distribution (Fig. 1). However, the separation of *V. incurvata* and *V. taritubensis* found by B. Neves et al. (unpublished manuscript) may be associated with vicariant events previously described for other species in that region near latitudes 22°S and 23°S (Palma-Silva et al., 2009; Martins, 2011). Thus, we propose that, after the southward

colonization of *V. incurvata*, populations did not undergo division or structuring due to oscillations in the late Quaternary period (Behling, 1998). Instead, the results of the ENM indicated that the appropriate areas for *V. incurvata* did not change significantly in the Pleistocene, and its geographic distribution was not fragmented, which explains the lack of phylogeographic structure found in the haplotype network and the low values of F_{ST} and G_{ST} . Climatic stability in the Quaternary period was reported for passerine species (Batalha-Filho et al., 2012) and *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* Nied. (Myrtaceae) (Bünger et al., 2016) in the southern portion of AF, revealing no changes in population size during the LGM.

The Fu’s tests based on the total data set had negative and significant values (Appendix S5), suggesting a demographic expansion of *V. incurvata*. Also, the BSP results (Appendix S6) indicated a recent and continual expansion (0.1 Ma), despite the large confidence interval found. The extension of AF during LGM is a controversial topic, because different studies have found contrasting patterns that indicate retraction, stability, or expansion of forest areas in different portions of the biome (Behling, 2002; Pessenda et al., 2009; Leite et al., 2016). The persistence of forest areas in the southern AF (Cabanne et al., 2013) and the expansion of suitable climatic conditions along the continental shelf during LGM (Leite et al., 2016; present study) should have allowed forests and forest-adapted species to expand, corroborating the evidence of expansion detected for *V. incurvata*. Thus, taking into account climatic data (Maxent analysis), the environment during the Pleistocene was not fragmented; that is, the area of occurrence of the species remained practically unaltered. However, the genetic data show that there was a population expansion; *V. incurvata* was able to disperse and increased demographically.

Genetic diversity and recent gene flow

Overall genetic diversity from the nuSSRs across the sampled localities of *V. incurvata* was moderate to high when compared with

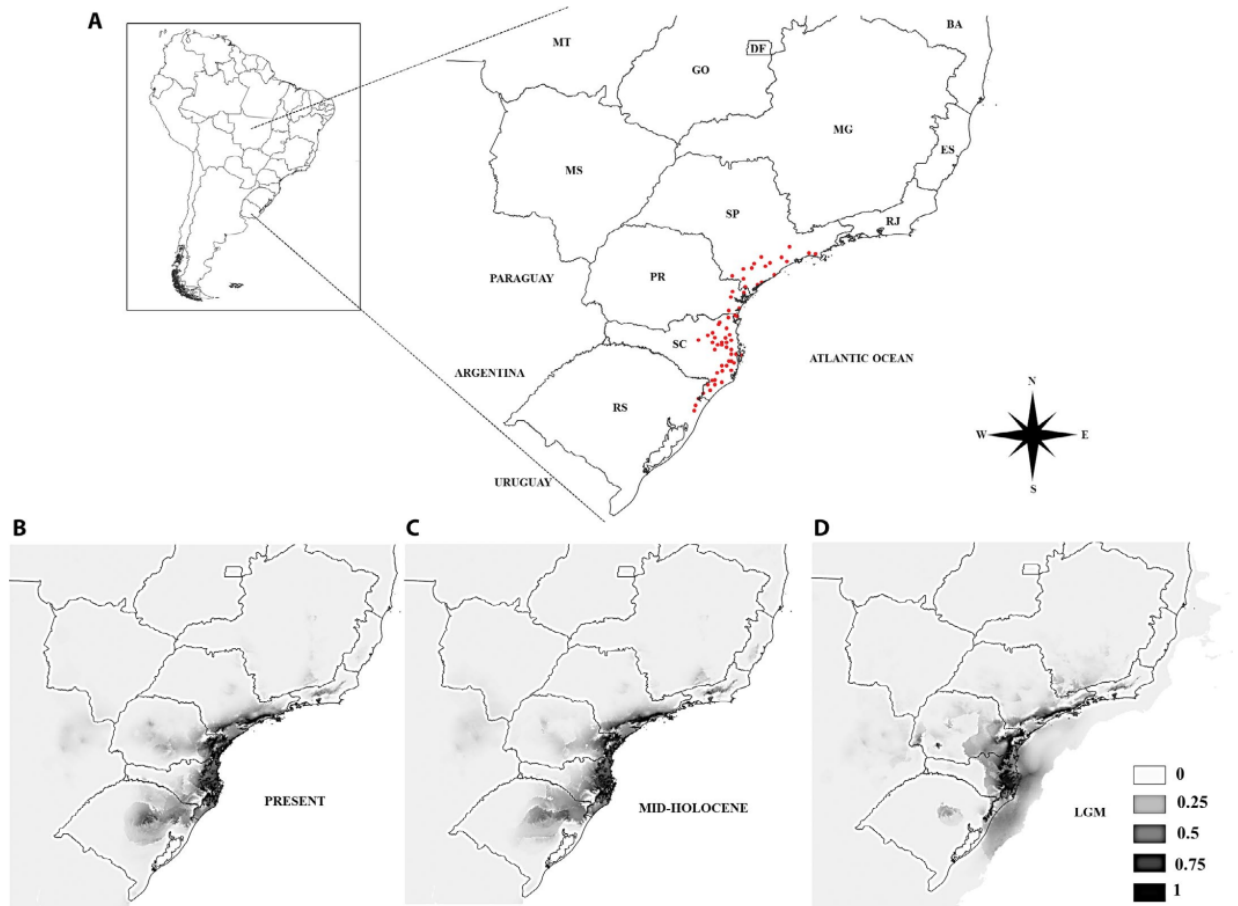


FIGURE 5. Ecological niche modelling (ENM) predictions for *Vriesea incurvata*. (A) Geographical coordinates sites along the Atlantic Forest, represented by red dots, used in the analysis. Predictions for (B) the present climatic conditions; (C) Mid-Holocene (~6000 years before the present [yBP]) and (D) LGM (Last Glacial Maximum ~21,000 yBP). The dark areas represent the higher probabilities of occurrence. RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná; SP, São Paulo; MS, Mato Grosso do Sul; MT, Mato Grosso; GO, Goiás; DF, Distrito Federal; MG, Minas Gerais; BA, Bahia; RJ, Rio de Janeiro; ES, Espírito Santo.

other bromeliads (Table 2; Palma-Silva et al., 2009; Lavor et al., 2014; Gonçalves-Oliveira et al., 2017; Goetze et al., 2018; Soares et al., 2018). Individuals from all localities had a high number of alleles (e.g., MRT with 111 alleles), and observed heterozygosities (H_o) varied from 0.267 to 0.595 (Table 2). These results agree with the cpDNA results discussed in the previous topic because the stable southern AF region might be reflected in the high genetic diversity observed today. Several historical and contemporary factors may influence the genetic diversity in natural populations. Species' establishment and/or persistence in a particular region depends on the suitability of that habitat, which is strongly related to historical factors such as climate and geological events and may therefore imprint a signal in the species genetic pool over time (Hewitt, 2000; Carvalho et al., 2017). Carvalho et al. (2017), studying *Euterpe edulis* Mart., a plant from AF, found that genetic diversity was higher in sites with historically stable climate. Other research noted high genetic diversity in areas considered a refuge for natural populations in the AF during the Quaternary climatic oscillations (Carnaval

et al., 2009; Leite et al., 2016). In agreement with these results, the results of the BOTTLENECK analysis (data not shown) suggested that populations have not experienced a recent or a strong bottleneck. Among the important factors that increase/maintain genetic variation within populations are gene flow from multiple source populations, explosive population growth, and a lack of bottleneck during colonization events (Ilves et al., 2015; Jermakowicz et al., 2017). On the other hand, all localities except CRP significantly departed from the HWE (Table 2) because of the high proportion of homozygotes, which is common in bromeliads (Palma-Silva et al., 2009; Zanella et al., 2011, 2012; Soares et al., 2018). Heterozygote deficiency may result from many factors, such as genetic drift and inbreeding, and may be closely related with the breeding system of the species (Hamrick and Godt, 1996). *Vriesea incurvata* is a self-compatible species (Martinelli, 1994) and, therefore, can have a mixed mating system, as is true of other *Vriesea* species (Paggi et al., 2007; Lavor et al., 2014), which potentiates the crossing among relatives and may explain the homozygotes excess.

In addition to the high/moderate diversity indexes encountered, the nuSSR data for plants of *V. incurvata* from the various localities had high connectivity and low genetic structure, reflecting high gene flow. The indices that estimate structure for nuSSR were all low, although many were significant (see Results, Table 3, and Appendix S2), likely because the effective number of migrants was high (Appendix S4), offering evidence of low differentiation among the localities. The structure results corroborated the low genetic structure encountered, suggesting a $K = 2$ value and demonstrating weak subdivision of the populations along *V. incurvata* distribution (Fig. 2). In the same sense, the DAPC results revealed three genetic groups and genetic mixture among the localities, indicating that, although weak, there is a recent tendency of structuring. Both results point to differentiated genetic profiles for *V. incurvata* at the edges of its distribution (SPO and MAQ) and a mixture of the two gene pools in the other localities, with the exception of MTN (Figs. 2, 3). The slight association between genetic and geographical distribution detected also corroborates these results. The successional stage of the forest is very important in maintaining the gene flow among populations or localities. Although the samples collected here were mostly from protected areas (Table 1), they all constitute small fragments with some degree of anthropogenic impact. In addition, the high gene flow we found supports the idea that these fragments are somehow connected; however, the fact that a recent weak structuring has been detected should not be ignored and requires further attention. Cascante-Marín et al. (2014), studying the bromeliad *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez in Costa Rica, detected significant genetic variation when comparing patches and continuous forest. The same authors concluded that the forest fragmentation limits the gene flow and consequently influences the local genetic structuring. We highlight the importance of the preservation of the remaining AF for the maintenance of genetic diversity and gene flow of *V. incurvata* and other species. Moreover, the type and behavior of the pollinators may be related to the high connectivity found. Machado and Semir (2006) reported the hummingbird *Phaethornis eurynome* as the most frequent floral visitor of *V. incurvata*. Hummingbirds such as *P. eurynome* have been reported to be long-distance foragers, increasing cross-pollination rates (Singer and Sazima, 2000). In relation to the contribution of pollen/seed flow, the ratio estimated was near zero; thus, we suggest that gene flow in *V. incurvata* is equally effective through pollen and seeds. This pattern is not commonly observed in bromeliads, because the most usual pattern is a higher gene flow via pollen (Palma-Silva et al., 2009; Paggi et al., 2010; Goetze et al., 2018). In the case of *V. incurvata*, the anemochory dispersion of plumose seeds seems to be very effective because events of long-distance dispersal facilitate gene flow between populations, counteract population subdivisions, and prevent the loss of genetic diversity (Jermakowicz et al., 2017). In *V. incurvata*, the efficient mechanisms of dispersion via pollen and seed are in accord with the high number of migrants encountered ($N_m > 1$; Appendix S4), the lack of phylogeographic structure, and the predicted stability for the southern AF, which favors colonization, establishment of the species, and its maintenance.

CONCLUSIONS

In conclusion, *V. incurvata* in the southern portion of the AF has levels of genetic diversity and structure that have not been shaped by climatic oscillations of the late Quaternary period. No historical

structuring was found, and a weak recent genetic structure was detected. High gene flow among localities was also revealed. *Vriesea incurvata*, despite occurring in the most threatened and fragmented biome of the world, shows no strong signs of genetic erosion, and pollinators and dispersion mechanisms are very effective.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank and recognize Felipe G. Pinheiro, Miriam V. Büttow, Maurício P. Almerão, Ademir Reis, Fabio Pinheiro for help with sample collection and fieldwork and Ana Lúcia Segatto for instruction and clarification on the ecological niche modeling analysis. We also thank two anonymous reviewers for valuable comments and suggestions, which substantially improved the manuscript. We thank IBAMA and State Departments of Environment for processing of collection permits. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 471775/2010-0 and 479413/2011-8) and a productivity research grant to A.F.C. (305704/2018-4), C.P.S. (300819/2016-1), and F.B. (303512/2012-1) and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PRONEX/FAPERGS; 10/0198-0), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2009/52725-3) and Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM-UFRGS). C.A.M. and C.M.Z. received a fellowship from CNPq (141892/2016-1 and 142065/2009-9). B.N. received a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES; 88881.132750/2016-01).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.M.Z., M.G., and C.P.S. collected the samples; C.M.Z. did lab work; C.A.M., C.M.Z., M.G., L.D.H., and B.N. analyzed data. All authors contributed to the discussion of the results and writing the manuscript. F.B., C.P.S., and C.M.Z. led the design of this study and F.B. led the group.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

APPENDIX S1. Localities sampled and geographic coordinates for the Atlantic Forest in the ecological niche modelling analyses based on data of Neves et al. (2018).

APPENDIX S2. Pairwise Φ_{ST} for localities based on cpDNA (*matK* + *trnL-trnF*) data set below diagonal and pairwise F_{ST} based on 13-nuSSR data set above. For locality abbreviation names, see Table 1.

APPENDIX S3. (A) Magnitude of ΔK from STRUCTURE analysis of K (mean \pm SD across 10 replicates), calculated using the ΔK method of Evanno et al. (2005), and (B) the optimal number of clusters using the silhouette method and PAM algorithm for *Vriesea incurvata* microsatellite data set.

APPENDIX S4. Bidirectional migration rates (effective number of migrants, N_m) between seven localities of *Vriesea incurvata* for 13 nuSSR data. For locality abbreviation names, see Table 1.

APPENDIX S5. Summary of neutrality tests for eight localities of *Vriesea incurvata* and in the total data set based on cpDNA (*matK* + *trnL-trnF*) data. Significant values are in bold ($P < 0.02$). For locality abbreviation names, see Table 1.

APPENDIX S6. Bayesian skyline plot showing the fluctuation in effective population size over time for *Vriesea incurvata*. The thick solid line represents the median estimate and the shaded area represents the 95% confidence interval. The time scale is in millions of years ago (Ma).

APPENDIX S7. Most important bioclimatic variable with $R \leq 0.75$ and percentage contribution of present and past models (MH and LGM).

LITERATURE CITED

- Álvarez-Presas, M., A. Sánchez-Gracia, F. Carbayo, J. Rozas, and M. Riutort. 2014. Insights into the origin and distribution of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hot spot: a statistical phylogeographic study using a low-dispersal organism. *Heredity* 112: 656–665.
- Antonelli, A., M. Ariza, J. Albert, T. Andermann, J. Azevedo, C. Bacon, S. Faurby, et al. 2018. Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. *PeerJ* 6: e5644.
- Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Batalha-Filho, H., A. M. Waldschmidt, L. A. O. Campos, M. G. Tavares, and T. M. Fernandes-Salomão. 2010. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41: 534–547.
- Batalha-Filho, H., G. S. Cabanne, and C. Y. Miyaki. 2012. Phylogeography of an Atlantic Forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892–902.
- Beerli, P., and J. Felsenstein. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152: 763–773.
- Behling, H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology* 99: 143–156.
- Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during the Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177: 19–27.
- Behling, H., and R. R. B. Negrelle. 2001. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research* 56: 383–389.
- Boneh, L., P. Kuperus, and P. H. Van Tienderen. 2003. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. *Molecular Ecology Notes* 3: 302–303.
- Brunes, T. O., M. T. C. Thomé, J. Alexandrino, C. F. B. Haddad, and F. Sequeira. 2015. Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the southern Brazilian Atlantic Forest. *Organisms Diversity and Evolution* 15: 695–710.
- Bünger, M. O., F. F. Mazine, F. Forest, M. L. Bueno, J. R. Stehmann, and E. J. Lucas. 2016. The evolutionary history of *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* (Myrtaceae) corroborates historically stable areas in the southern Atlantic Forest. *Annals of Botany* 118: 1209–1223.
- Cabanne, G. S., F. M. d'Horta, E. H. R. Sari, F. R. Santos, and C. Y. Miyaki. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760–773.
- Cabanne, G. S., E. H. R. Sari, D. Meyer, F. R. Santos, and C. Y. Miyaki. 2013. Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish Schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). *Journal of Ornithology* 154: 371–384.
- Cabanne, G. S., L. Calderón, N. T. Arias, P. Flores, R. Pessoa, F. M. d'Horta, and C. Y. Miyaki. 2016. Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 119: 856–872.
- Carnaval, A. C., and C. Moritz. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187–1201.
- Carnaval, A. C., M. J. Hickerson, C. F. B. Haddad, M. T. Rodrigues, and C. Moritz. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science* 323: 785–789.
- Carnaval, A. C., E. Waltari, M. T. Rodrigues, D. Rosauer, J. VanDerWal, R. Damasceno, I. Prates, et al. 2014. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society, B, Biological Sciences* 281: 20141461.
- Carvalho, C. S., L. Ballesteros-Mejia, M. C. Ribeiro, M. C. Côrtes, A. S. Santos, and R. G. Collevatti. 2017. Climatic stability and contemporary human impacts affect the genetic diversity and conservation status of a tropical palm in the Atlantic Forest of Brazil. *Conservation Genetics* 18: 467–478.
- Cascante-Marin, A., G. Oostermeijer, J. Wolf, and E. J. Fuchs. 2014. Genetic diversity and spatial genetic structure of an epiphytic bromeliad in Costa Rican montane secondary forest patches. *Biotropica* 46: 425–432.
- Costa, A. F., J. Gomes-da-Silva, and M. G. L. Wanderley. 2014. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomic history, and morphology of the Brazilian lineages. *Journal of the Torrey Botanical Society* 141: 338–352.
- Costa, A. F., J. Gomes-da-Silva, and M. G. L. Wanderley. 2015. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): a cladistic analysis of eastern Brazilian species based on morphological characters. *Rodriguésia* 66: 429–440.
- Costa, G. C., A. Hampe, M. P. Ledru, P. A. Martinez, G. G. Mazzochini, D. B. Shepard, F. P. Werneck, et al. 2018. Biome stability in South America over the last 30 kyr: Inferences from long-term vegetation dynamics and habitat modelling. *Global Ecology and Biogeography* 27: 285–297.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- D'Horta, F. M., G. S. Cabanne, D. Meyer, and C. Y. Miyaki. 2011. The genetic effects of the Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1923–1935.
- Dieringer, D., and C. Schlötterer. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167–169.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Drummond, A. J., and A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro, and O. G. Pybus. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185–1192.
- Drummond, A. J., M. A. Suchard, D. Xie, and A. Rambaut. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- Earl, D. A., and B. M. vonHoldt. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

- Givnish, T. J., M. H. J. Barfuss, B. Van Ee, R. Riina, K. Schulte, R. Horres, P. A. Gonsiska, et al. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 872–895.
- Goetze, M., C. Palma-Silva, C. M. Zanella, and F. Bered. 2016. East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 477–490.
- Goetze, M., C. M. Zanella, C. Palma-Silva, M. V. Büttow, and F. Bered. 2017. Incomplete lineage sorting and hybridization in the evolutionary history of closely related, endemic yellow-flowered *Aechmea* species of subgenus *Ortgiesia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 104: 1073–1087.
- Goetze, M., F. Capra, M. V. Büttow, C. M. Zanella, and F. Bered. 2018. High genetic diversity and demographic stability in *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), a species of sandy coastal plains (restinga habitat) in southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 374–388.
- Gonçalves-Oliveira, R. C., T. Wöhrmann, A. M. Benko-Iseppon, F. Krapp, M. Alves, M. G. L. Wanderley, and K. Weising. 2017. Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): the role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *American Journal of Botany* 104: 868–878.
- Gouda, E. J., D. Butcher, and C. S. Gouda. 2019 [continuously updated]. Encyclopaedia of bromeliads, version 4. Website <http://bromeliad.nl/encyclopedial/>. University Botanic Gardens, Utrecht, Netherlands [accessed 13 June 2019].
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Hamrick, J. L., and M. J. W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B, Biological Sciences* 351: 1291–1298.
- Hedrick, P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59: 1633–1638.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice age. *Nature* 405: 907–913.
- Hijmans, R. J. 2017. RASTER package v.2.6-7 Geographic data analysis and modelling. Website <http://www.rspatial.org/> [accessed 30 August 2018].
- Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones, and A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Ives, A., M. Metsare, K. Tali, and T. Kull. 2015. The impact of recent colonization on the genetic diversity and fine-scale genetic structure in *Orchis militaris* (L.). *Plant Systematics and Evolution* 301: 1875–1886.
- Jermakowicz, E., E. Brzozko, J. Kotowicz, and A. Wróblewska. 2017. Genetic diversity of orchid *Malaxis monophyllos* over European range as an effect of population properties and postglacial colonization. *Polish Journal of Ecology* 65: 69–86.
- Jombart, T. 2008. ADEGENET: an R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403–1405.
- Jombart, T., and I. Ahmed. 2011. ADEGENET 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27: 3070–3071.
- Jombart, T., S. Devillard, and F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 1–15.
- Lavor, P., C. V. D. Berg, C. M. Jacobi, F. F. Carmo, and L. M. Versieux. 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the iron quadrangle, Espinhaço range, Brazil. *American Journal of Botany* 101: 1167–1175.
- Leal, B. S. S., C. Palma-Silva, and F. Pinheiro. 2016. Phylogeographic studies depict the role of space and time scales of plant speciation in a highly diverse Neotropical region. *Critical Reviews in Plant Sciences* 35: 215–230.
- Leal, B. S. S., L. R. Medeiros, E. A. Peres, T. Sobral-Souza, C. Palma-Silva, G. Q. Romero, and C. M. A. Carareto. 2018. Insights into the evolutionary dynamics of Neotropical biomes from the phylogeography and paleodistribution modeling of *Bromelia balansae*. *American Journal of Botany* 105: 1725–1734.
- Ledru, M. P., D. D. Rousseau, F. W. Cruz Jr, C. Riccomini, I. Karmann, and L. Martin. 2005. Paleoclimatic changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research* 64: 444–450.
- Leite, Y. L. R., L. P. Costa, A. C. Loss, R. G. Rocha, H. Batalha-Filho, A. C. Bastos, V. S. Quaresma, et al. 2016. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 113: 1008–1013.
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics Applications Note* 25: 1451–1452.
- Machado, C. G., and J. Semir. 2006. Fenologia da floração e biologia floral de bromeliáceas ornitófilas de uma área da Mata Atlântica do sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 163–174.
- Magalhães, R. I., and J. E. A. Mariath. 2012. Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1881–1895.
- Martinelli, G. 1994. Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. Ph.D. dissertation, University of St. Andrews, St. Andrews, Scotland, UK.
- Martinelli, G., C. M. Vieira, M. Gonzalez, P. Leitman, A. Piratininga, A. F. Costa, and R. C. Forzza. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59: 209–258.
- Martins, F. M. 2011. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: What do phylogeographical studies tell us? *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 499–509.
- Martins, F. M., A. R. Templeton, A. C. O. Pavan, B. C. Kohlbach, and J. S. Morgante. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 9: 294.
- Menezes, L., C. Canedo, H. Batalha-Filho, A. A. Garda, M. Gehara, and M. F. Napoli. 2016. Multilocus phylogeography of the treefrog *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) reveals Plio-Pleistocene diversification in the Atlantic Forest. *PLoS One* 11: e0154626.
- Morellato, L. P. C., and C. F. B. Haddad. 2000. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786–792.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. Fonseca, and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nakazato, T., D. L. Warren, and L. C. Moyle. 2010. Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany* 97: 680–693.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, NY, NY, USA.
- Nei, M., and R. K. Chesser. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* 47: 253–259.
- Neves, B., F. P. Uribbe, S. S. A. Jacques, C. M. Zanella, and A. F. Costa. 2018. Species boundaries in the *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae) complex after a broad morphometric and taxonomic study. *Systematic Botany* 43: 870–888.
- Paggi, G. M., C. Palma-Silva, L. C. T. Silveira, E. Kaltchuk-Santos, M. H. Bodanese-Zanettini, and F. Bered. 2007. Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) in southern Brazil. *American Journal of Botany* 94: 683–689.
- Paggi, G. M., C. Palma-Silva, F. Bered, F. W. Cidade, A. C. B. Sousa, A. P. Souza, T. Wendt, and C. Lexer. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Resources* 8: 980–982.
- Paggi, G. M., J. A. T. Sampaio, M. Bruxel, C. M. Zanella, M. G. Goetze, M. V. Büttow, C. Palma-Silva, and F. Bered. 2010. Seed dispersal and population structure in *Vriesea gigantea*, a bromeliad from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 317–325.
- Palma-Silva, C., M. M. Cavallari, T. Barbará, C. Lexer, M. A. Gimenes, F. Bered, and M. H. Bodanese-Zanettini. 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads species. *Molecular Ecology Notes* 7: 654–657.
- Palma-Silva, C., C. Lexer, G. M. Paggi, T. Barbará, F. Bered, and M. H. Bodanese-Zanettini. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA

- diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- Pellegrino, K. C. M., M. T. Rodrigues, A. N. Waite, M. Morando, Y. Y. Yassuda, and J. W. Sites Jr. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13–26.
- Peres, E. A., T. Sobral-Souza, M. F. Perez, I. A. S. Bonatelli, D. P. Silva, M. J. Silva, and V. N. Solferini. 2015. Pleistocene niche stability and lineage diversification in the subtropical spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). *PLoS One* 10: e0121543.
- Pessenda, L. C. R., P. E. D. Oliveira, M. Mofatto, V. B. D. Medeiros, R. J. F. Garcia, R. Aravena, J. A. Bendassoli, et al. 2009. The evolution of a tropical rainforest/grassland mosaic in southeastern Brazil since 28,000 ¹⁴C yr BP based on carbon isotopes and pollen records. *Quaternary Research* 71: 437–452.
- Petit, R. J., J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvini, and G. G. Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689–701.
- Phillips, S. J. 2017. A brief tutorial on Maxent. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/ [accessed 20 August 2018].
- Phillips, S. J., R. P. Anderson, and R. E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Pinheiro, F., F. Barros, C. Palma-Silva, M. F. Fay, C. Lexter, and S. Cozzolino. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography* 38: 1923–1935.
- Pinheiro, F., M. V. Dantas-Queiroz, and C. Palma-Silva. 2018. Plant species complexes as models to understand speciation and evolution: a review of South American studies. *Critical reviews in plant sciences* 37: 54–80.
- Piry, S., G. Luikart, and J. M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502–503.
- Prance, G. T. 1982. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 69: 594–624.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Qgis Development Team. 2018. QGIS Geographic Information System, v. 3.2.2 Bonn. Open Source Geospatial Foundation Project, website <http://qgis.osgeo.org> [accessed 22 August 2018].
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing, v. 3.5.1. The R foundation for statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rambaut, A. 2014. FigTree v1.4.2: tree figure drawing tool. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Ribeiro, M. C., J. P. Metzger, A. C. Martensen, F. J. Ponzoni, and M. M. Hirota. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Ribeiro, R. A., J. P. Lemos-Filho, A. C. S. Ramos, and M. B. Lovato. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46–57.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Segatto, A. L. A., M. Reck-Kortmann, C. Turchetto, and L. B. Freitas. 2017. Multiple markers, niche modelling, and bioregions analyses to evaluate the genetic diversity of a plant species complex. *BMC Evolutionary Biology* 17: 234.
- Singer, R. B., and M. Sazima. 2000. The pollination of *Stenorhynchos lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in south-eastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 223: 221–227.
- Smith, L. B., and R. J. Downs. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph 14, part 2, 663–1492. Organization for Flora Neotropica by Hafner Press, NY, NY, USA.
- Soares, L. E., M. Goetze, C. M. Zanella, and F. Bered. 2018. Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from southern Brazilian highlands. *Genetics and Molecular Biology* 41: 308–317.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Thode, V. A., G. A. Silva-Arias, C. Turchetto, A. L. A. Segatto, G. Mäder, S. A. Bonatto, and L. B. Freitas. 2014. Genetic diversity and ecological niche modelling of the restricted *Recordia reitzii* (Verbenaceae) from southern Brazilian Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society* 176: 332–348.
- Thomé, M. T. C., K. R. Zamudio, J. G. R. Giovanelli, C. F. B. Haddad, F. A. Baldissera Jr, and J. Alexandrino. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018–1031.
- Turchetto-Zolet, A. C., F. Pinheiro, F. Salgueiro, and C. Palma-Silva. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22: 1193–1213.
- Turchetto-Zolet, A. C., F. Salgueiro, C. Turchetto, F. Cruz, N. M. Veto, M. J. F. Barros, A. L. A. Segatto, et al. 2016. Phylogeography and ecological niche modelling in *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) suggest distinct vegetational responses to climate change between the southern and northern Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 670–688.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Zanella, C. M., M. Bruxel, G. M. Paggi, M. Goetze, M. V. Buttow, F. W. Cidade, and F. Bered. 2011. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 98: 1511–1519.
- Zanella, C. M., A. Janke, C. Palma-Silva, E. Kaltchuk-Santos, F. G. Pinheiro, G. M. Paggi, L. E. S. Soares, et al. 2012. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1020–1026.
- Zanella, C. M., C. Palma-Silva, M. Goetze, and F. Bered. 2016. Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 491–504.

APPENDIX 1. Vouchers for *Vriesea incurvata* localities analyzed. (Locality),

Country, state, city, collectors, collector number, (herbarium abbreviation), voucher number. There was one voucher per locality to avoid unnecessary extraction, because this is an endemic species from a threatened biome. Localities are described in Table 1; R: Herbário do Museu Nacional; FLOR: Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina; SP: Herbário do Estado "Maria Eneyda P. Kaufmann Fidalgo"-Coleção de Fanerógamas.

Vriesea incurvata Gaudich.: (MAQ), Brazil, Rio Grande do Sul, Maquiné, B. Neves, R. Moura, S. Kunh and M. L. Gaeta, 175, (R), 219322; (FLO), Brazil, Santa Catarina, Florianópolis, B. Neves and F. P. Uribbe, 124, (R), 219265; (ATC), Brazil, Santa Catarina, Antônio Carlos, D. B. Falkenberg and A. Zanin, 5785, (FLOR), 22616; (CRP), Brazil, Santa Catarina, Corupá, B. Neves, F. P. Uribbe and J. Néri, 128, (R), 219324; (JVL), Brazil, Santa Catarina, Joinville, B. Neves and F. P. Uribbe, 203, (R), 219335; (MTN), Brazil, Paraná, Matinhos, B. Neves and J. Néri, 206, (R), 219338; (MRT), Brazil, Paraná, Morretes, B. Neves, F. P. Uribbe and J. Néri, 138, (R), 219267; (CAN), Brazil, São Paulo, Cananéia, R. Moura, J. Gomes-da-Silva, B. Neves, A. P. Pinto and L. G. Nogueira, 1018, (R), 219391; (SPO), Brazil, São Paulo, São Paulo, R. T. Shirasuna, R. Suzuki, and F. Aguiar, 682, (SP), 430361.

Appendix S1. Localities and geographical coordinates of the Atlantic Forest used in the ecological niche modelling analyses, based on Neves et al. (2018) data collection.

Municipality/Locality	Brazilian State ^a	Latitude S	Longitude W
Maquiné	RS	-29.504806	-50.239806
Caraá	RS	-29.706944	-50.291056
Joinville	SC	-26.141944	-48.980278
São Bento do Sul	SC	-26.324722	-49.313333
Grão Pará	SC	-28.188333	-49.213889
Blumenau	SC	-26.920833	-49.091667
Corupá	SC	-26.393611	-49.354167
Itapoá	SC	-26.082321	-48.640606
Ilhota-Morro do Baú	SC	-26.799722	-48.930833
Massaranduba	SC	-26.550278	-49.050556
Doutor Pedrinho	SC	-26.7275	-49.585278
Treviso	SC	-28.529167	-49.497222
Imaruí	SC	-28.164722	-48.869722
Siderópolis	SC	-28.549444	-49.603889
Taió	SC	-27.000278	-50.130556
Florianópolis	SC	-27.576667	-48.475556
Antônio Carlos	SC	-27.539444	-48.870278
Paulo Lopes	SC	-27.878889	-48.761944
Benedito Novo	SC	-26.910278	-49.500278
Presidente Nereu	SC	-27.181389	-49.231389
São José	SC	-27.540278	-48.689444
Apiúna	SC	-27.180278	-49.393611
Orleans	SC	-28.259722	-49.411944
Jacinto Machado	SC	-29.045278	-49.945278
Santa Rosa de Lima	SC	-27.989722	-49.230833
Indaial	SC	-27.09	-49.230833
Morro Grande	SC	-28.71	-49.77
São Bonifácio	SC	-27.989167	-49.048889
Praia Grande	SC	-29.249722	-50.129722
Águas Mornas	SC	-27.809722	-48.960833

Estudo Filogeográfico e Hibridação em um grupo de espécies de *Vriesea*

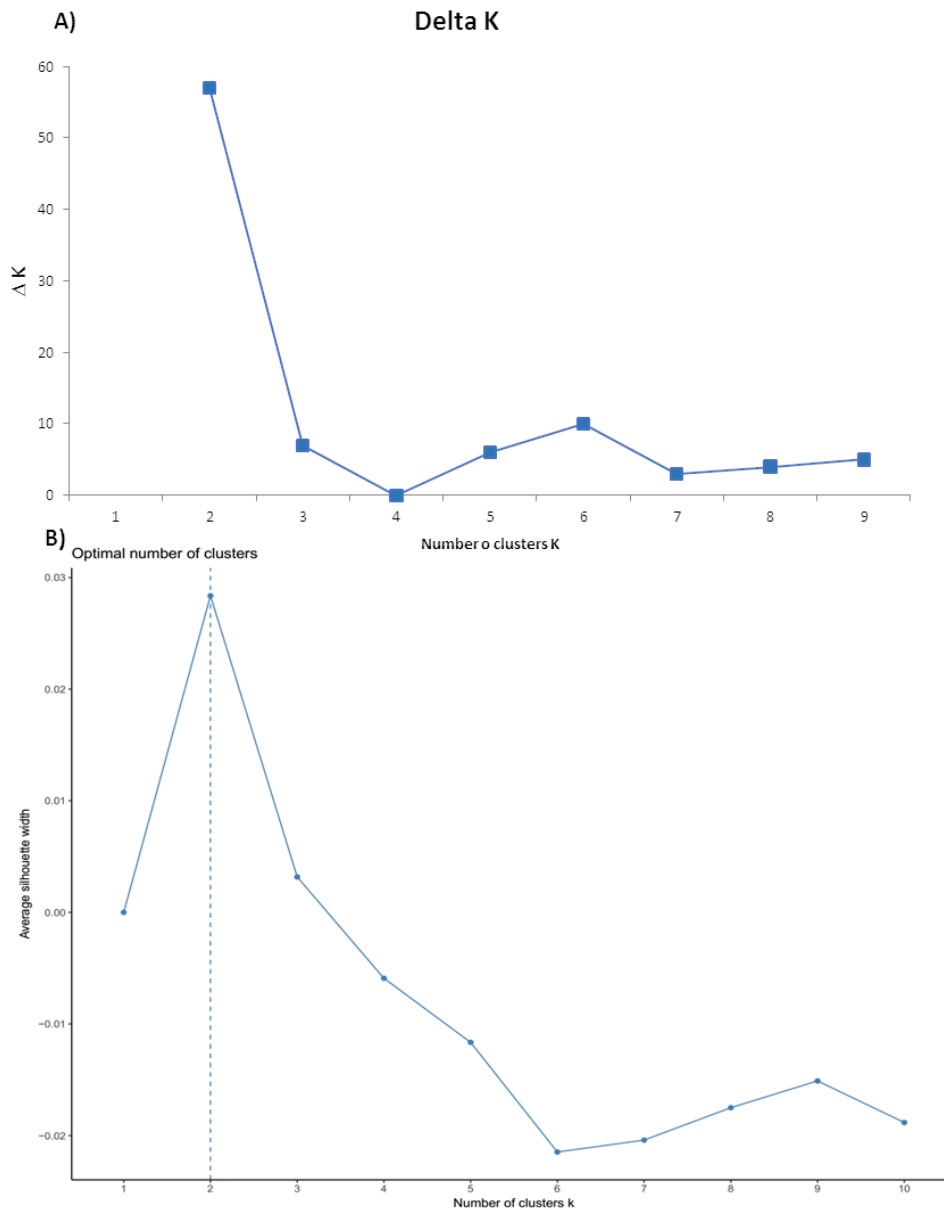
Vitor Meireles	SC	-26.821667	-49.77
Garuva	SC	-26.055025	-48.727225
Santo Amaro da Imperatriz	SC	-27.81	-48.866944
Botuverá	SC	-27.268611	-49.051944
Guabiruba	SC	-27.09	-49.049444
Ituporanga	SC	-27.360833	-49.503056
Nova Veneza	SC	-28.710833	-49.499444
Brusque	SC	-27.005556	-48.869722
São João Batista	SC	-27.359722	-48.8675
Morro da Fumaça	SC	-28.619167	-49.232222
Rio do Sul	SC	-27.090278	-49.590555
Turvo	SC	-28.926667	-49.679444
Guaraqueçaba	PR	-25.180556	-48.385361
Morretes	PR	-25.347389	-48.885889
Matinhos	PR	-25.782323	-48.562387
Guaratuba	PR	-25.868889	-48.966667
Campina Grande do Sul	PR	-25.1377	-48.8215
Tapiraí	SP	-24.035697	-47.382837
Juquiá	SP	-24.16529	-47.55991
Cajati	SP	-24.953056	-48.334167
Ribeirão Grande	SP	-24.271778	-48.40525
Salesópolis	SP	-23.656222	-45.88775
São Miguel Arcanjo	SP	-24.063611	-47.991472
São Lourenço da Serra	SP	-23.824667	-46.939778
Eldorado	SP	-24.643333	-48.400278
Mairiporã	SP	-23.420833	-46.633333
Sete Barras	SP	-24.233333	-48.083333
São Paulo	SP	-23.983333	-46.733333
Caraguatatuba	SP	-23.692222	-45.633333
Iguape	SP	-24.783333	-47.7
Pariquera-Açu/ Cananéia	SP	-24.879444	-47.858333
Miracatu	SP	-24.5	-47.216667
Iporanga	SP	-24.533333	-48.833333
Pilar do Sul	SP	-23.8131	-47.7164

^a RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná; SP, São Paulo.

Appendix S2. Localities pairwise Φ_{ST} based on cpDNA (*matK* + *trnL-trnF*) data set below the diagonal and pairwise F_{ST} based on the 13-nuSSR data set above. For locality abbreviation names, see Table 1.

Locality	MAQ	FLO	ATC	CRP	MTN	MRT	CAN	SPO
MAQ	-	0.071***	0.057***	0.004	0.105***	0.035***	-	0.094***
FLO	-0.079	-	0.016	0.032*	0.065**	0.049**	-	0.112***
ATC	0.065	-0.615	-	0.026*	0.012	0.034*	-	0.066**
CRP	0.008	0.017	0.121	-	0.067***	0.004	-	0.038*
MTN	-0.007	-0.245	-0.355	0.080	-	0.074***	-	0.046
MRT	0.088	-0.186	-0.341	0.115	-0.078	-	-	0.059**
CAN	0.343	-0.200	-0.615	0.366	-0.100	-0.156	-	-
SPO	0.539*	0.205	-0.096	0.556*	0.203*	0.090	-0.167	-

Notes: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$



Appendix S3. (A) Magnitude of ΔK from structure analysis of K (mean \pm SD across 10 replicates), calculated using the ΔK method of Evanno et al. (2005), and (B) the optimal number of clusters using the silhouette method and PAM algorithm for *Vriesea incurvata* microsatellite data set.

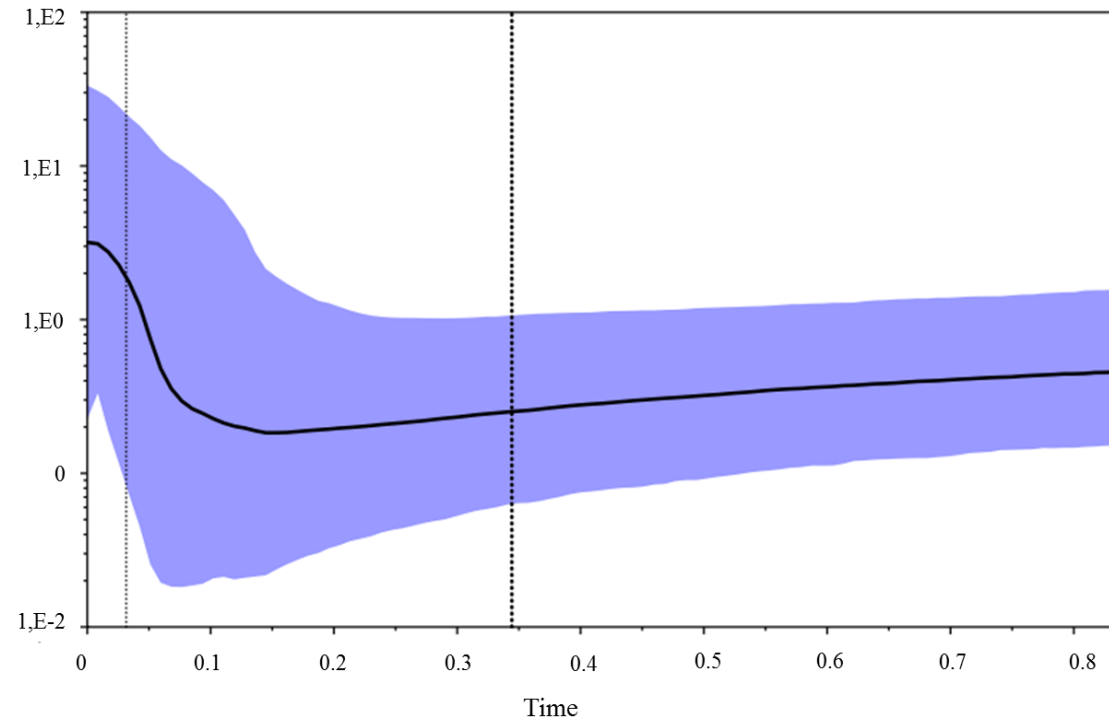
Appendix S4. Bidirectional migration rates (effective number of migrants, $N_e m$) between seven localities of *Vriesea incurvata* for 13-nuSSR data. For locality abbreviation names, see Table 1.

MAQ	0.738	FLO	FLO	0.856	ATC	ATC	2.117	CRP	CRP	1.232	MTN	MTN	2.011	MRT	MRT	2.687	SPO
	$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$	
	1.201			1.514			1.377			2.202			3.964			3.837	
MAQ	0.871	ATC	FLO	1.012	CRP	ATC	2.026	MTN	CRP	2.891	MRT	MTN	1.701	SPO			
	$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$				
	2.180			1.351			1.732			3.267			3.157				
MAQ	1.784	CRP	FLO	0.811	MTN	ATC	2.190	MRT	CRP	1.082	SPO						
	$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$							
	3.344			1.738			3.263			2.219							
MAQ	1.163	MTN	FLO	1.203	MRT	ATC	1.022	SPO									
	$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$										
	1.834			1.405			2.087										
MAQ	1.558	MTN	FLO	0.778	SPO												
	$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$			$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$													
	3.291			1.618													
MAQ	0.506	SPO															
	$\begin{matrix} \rightarrow \\ \leftarrow \end{matrix}$																
	0.983																

* The arrows represent the direction of migration.

Appendix S5. Summary of neutrality tests performed in eight localities of *Vriesea incurvata* and in the total data set based on cpDNA (*matK* + *trnL-trnF*) data. Significant values are in bold ($P < 0.02$). For locality abbreviation names, see Table 1.

Statistic \ Locality	MAQ	FLO	ANT	CRP	MTN	MRT	CAN	SPO	Total
Tajima's <i>D</i>	-1.401	0.000	0.000	-1.006	-0.447	-0.761	0.000	-1.237	-1.053
Fu's <i>F_s</i>	-1.164	0.201	0.000	-0.922	0.117	-1.139	0.201	-0.922	-4.681



Appendix S6. Bayesian skyline plot showing the fluctuation in effective population size over time for *Vriesea incurvata*. The thick solid line represents the median estimate and the shaded area represents the 95% confidence interval. The time scale is in millions of years ago (Ma).

Appendix S7. Most important bioclimatic variable with $R \leq 0.75$ and percent contribution of present, and past models (MH and LGM).

Bioclimatic Variable	CODE	Contribution (%)		
		Present	MH	LGM
Min temperature of coldest month	Bio-6	30.9	28.5	19
Mean temperature of warmest quarter	Bio-10	18.4	16.7	27.7
Annual precipitation	Bio-12	28	30.5	0.7
Precipitation of driest month	Bio-14	2.2	4	7.3
Precipitation seasonality (coefficient of variation)	Bio-15	8.6	6.6	1.7
Precipitation of coldest quarter	Bio-19	11.9	13.7	43.6

MH: Mid-Holocene and LGM: Last Glacial Maximum.

CAPÍTULO IV
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Mata Atlântica é reconhecida como o principal centro de diversidade do gênero *Vriesea* (Martinelli *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2014), além de ser considerada, juntamente com o Chaco, o berço das linhagens ancestrais da subtribo Vrieseinae, ao qual *Vriesea* pertence (Barfuss *et al.*, 2016; Leme *et al.*, 2017; Kessous *et al.*, 2020). Sendo assim, esse bioma pode ser considerado um interessante laboratório para estudos evolutivos do gênero. Na presente tese, foram estudadas espécies do “grupo das infladas”, um dos grupos monofiléticos presentes na Mata Atlântica (Costa *et al.*, 2015; Gomes-da-Silva e Souza-Chies, 2017), a fim de compreender os padrões históricos (Capítulo II) e o relacionamento interespecífico destas espécies (Capítulo III), vindo à somar junto a outros trabalhos (Matos *et al.*, 2016; Zanella *et al.*, 2016; Neri *et al.*, 2017b; Neves *et al.*, 2018; 2019; 2020) na compreensão dos processos evolutivos destas espécies e do gênero *Vriesea* como um todo.

A espécie *Vriesea incurvata* originalmente tinha sua distribuição geográfica descrita como sendo do estado do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro (Smith e Downs, 1977; Martinelli, 1994; Martinelli *et al.*, 2008). No entanto, em um trabalho de morfometria, com espécies que formam o chamado “complexo *V. incurvata*”, os indivíduos do norte de São Paulo e Rio de Janeiro foram recircunscritos como *V. taritubensis* e suas variedades, e a distribuição de *V. incurvata* ficou delimitada do centro-sul de SP ao RS (Neves *et al.*, 2018). Além do mais, a partir de sequências plastidiais observou-se que não há compartilhamento de haplótipos entre *V. incurvata* e as variedades de *V. taritubensis*, e também a ocorrência de uma quebra filogeogeográfica entre estas espécies na região da Serra da Bocaina em SP, por volta de 5 Ma, no Plioceno (Neves *et al.*, 2019). Tais evidências históricas, somadas ao fato de *V. incurvata* apresentar uma das maiores distribuições geográficas do “grupo das infladas” (Neves *et al.*, 2018) motivou nossa equipe a investigar os padrões históricos, de estrutura e diversidade genética desta espécie em populações da porção sul da Mata Atlântica, região à qual ela é endêmica. Essa investigação culminou no segundo capítulo desta tese, no artigo intitulado “Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest”, publicado no ano de 2019 na revista *American Journal of Botany*. Em resumo, os resultados dos marcadores plastidiais indicaram uma falta de estruturação filogeográfica com um alto compartilhamento de

haplótipos entre as populações e uma diversidade genética que pode ser considerada moderada/alta nas populações estudadas. Na modelagem de nicho, observamos que as áreas mais adequadas para a ocorrência da espécie nos períodos do Último Máximo Glacial e Holoceno Médio não variaram muito em relação a distribuição atual. Assim, juntamente com os resultados demográficos, concluímos que após a colonização da porção sul da Mata Atlântica, *V. incurvata* se manteve estável, não tendo sua estrutura populacional afetada pelas mudanças climáticas do Quaternário, indicando que a porção sul da Mata Atlântica foi estável durante este período. Já os marcadores microssatélites nucleares também indicaram uma moderada/alta diversidade genética e um elevado número de migrantes entre as populações; apesar disso foi observada uma ligeira estruturação populacional. Embora a maioria das populações amostradas estejam situadas em áreas de proteção ambiental, e de algum grau de conectividade existir entre elas (indicada pelos níveis de diversidade e número de migrantes), estas estão presentes em fragmentos da floresta, com diferentes graus de impacto antrópico. Desta forma, a recente estruturação genética, mesmo que baixa, deve ser considerada um sinal de alerta, para que haja a manutenção dos fragmentos florestais que ainda restam, ou mesmo possíveis corredores ecológicos entre estes.

A fim de investigar a possível hibridação e, por conseguinte inferir sobre a eficácia das barreiras reprodutivas em espécies do “grupo das infladas”, foram selecionadas três localidades na Mata Atlântica onde estas espécies ocorrem em simpatria, dando origem ao Capítulo III desta tese (dados ainda não publicados). Uma das localidades é Santa Virgínia onde foram analisadas as espécies *V. carinata*, *V. taritubensis* var. *patens*, *V. simplex* e *V. agostiniana*. As outras duas localidades são Boraceia e Joinville onde foram estudadas as espécies *V. incurvata* e *V. inflata*, e *V. carinata* e *V. incurvata*, respectivamente. Em Santa Virgínia, além das espécies mencionadas, foi possível encontrar quatro indivíduos com uma morfologia atípica, os quais denominamos de *Vriesea* híbridos putativos (VHP). Para avaliar o fluxo gênico interespecífico entre as espécies em cada localidade, foram utilizados até 12 marcadores nucleares do tipo microssatélite. Além disso, para avaliar as diferenças morfológicas entre as espécies nas localidades foram analisadas 10 variáveis, quatro relacionadas à parte vegetativa e seis a parte reprodutiva. Os resultados indicaram uma alta taxa de hibridação e uma baixa estruturação entre as espécies em cada localidade. Dos indivíduos identificados morfológicamente como uma das espécies, 45% apresentaram

perfil molecular híbrido em Santa Virgínia (incluindo VHP), em Boraceia e Joinville essa porcentagem foi de 42,32% e 22,86%, respectivamente. Afora os indivíduos VHP, os demais indivíduos que apresentaram perfil molecular híbrido, apesar de ser possível observar algumas características morfológicas ligeiramente diferentes do comum em alguns deles, nas análises morfológicas, de modo geral, agruparam junto aos indivíduos puros, ou seja, fenotipicamente eles se parecem com os parentais. Dos quatro indivíduos identificados com características morfológicas atípicas (VHP) e corroborados pelos resultados genéticos, um apresentou perfil molecular entre *V. carinata* e *V. taritubensis* var. *patens*, os outros três apresentaram perfil molecular de três espécies (*V. carinata*, *V. taritubensis* var. *patens* e *V. simplex*). Apesar dos cruzamentos entre *V. carinata* e VHP terem gerado frutos e nas análises morfológicas estes indivíduos se agruparem com *V. carinata*, não foi possível realizar o cruzamento destes híbridos com *V. taritubensis* var. *patens* e *V. simplex*, e também não foi possível classificar com precisão a qual classe híbrida estes indivíduos pertencem, dificultando afirmar quem seriam seus parentais. *Vriesea agostiniana*, de Santa Virgínia, foi a única espécie dentre as demais (*V. carinata*, *V. taritubensis* var. *patens* e *V. simplex*), que não apresentou um perfil molecular próprio; dos seis indivíduos coletados, quatro apresentaram perfil molecular híbrido e dois apresentaram perfil da espécie *V. simplex*. O fato de poucos indivíduos terem sido encontrados na população é algo que deve ser levado em consideração na discussão sobre o motivo de *V. agostiniana* não ter apresentado um perfil próprio. Também, devido a este fato pode-se especular que esta espécie possa estar à beira de um colapso nesta população, podendo ser extinta em poucas gerações. Outro aspecto que pode ser levado em consideração é a possível origem híbrida desta espécie. Para testar essa hipótese, as outras duas populações reconhecidas (Kessous *et al.*, 2018) devem ser analisadas, avaliando as espécies que coocorrem com ela, e também analisando o genoma plastidial destas espécies. As altas taxas de hibridação observadas nas localidades estudadas indicam que as barreiras reprodutivas são permeáveis nestas espécies. Apesar de não termos realizado observação de polinizadores, é relatado na literatura que muitas destas espécies apresentam como visitantes florais os beija-flores *Phaethornis eurynome* Lesson e *Ramphodon naevius* Dumont (Araujo *et al.*, 1994; Machado e Semir, 2006; Wendt *et al.*, 2008; Silva e Piratelli, 2014). Além disso, um estudo de rede de polinizadores na localidade de Santa Virgínia, identificou *P. eurynome* como o único polinizador das espécies de *Vriesea* da região

(Vizentin-Bugoni *et al.*, 2014). Ademais, nas saídas de campo foi possível observar que havia floração sequencial com alguma sobreposição. Tal observação pode ser corroborada pelos períodos de floração descritos para as espécies na literatura, além do fato de que a sobreposição de floração é comum em populações simpátricas de bromélias (Wendt *et al.*, 2008). O compartilhamento de polinizadores e sobreposição de floração estão relacionados às barreiras reprodutivas pré-polinização, contudo não podemos afirmar categoricamente quais das barreiras reprodutivas (pré-polinização (mecanismo pré-zigóticos) ou pós-polinização (mecanismos pré e pós-zigóticos)) estão sendo mais permeáveis nestas espécies. Para isso seriam necessários mais experimentos, como cruzamentos, viabilidade das sementes e crescimento do tubo polínico. Outro fator a ser levado em consideração é que as localidades analisadas, apesar de duas estarem em áreas de proteção ambiental, apresentam um impacto antrópico evidente. De fato, os distúrbios antrópicos como o desmatamento, agricultura, introdução de espécies exóticas, podem levar a formação de novos nichos e ao contato entre populações que estavam isoladas, podendo ocasionar a hibridação entre as espécies (Lamont *et al.*, 2003; Harrison e Larson, 2014).

Desta forma, os resultados obtidos na presente tese, contribuíram para o melhor entendimento dos padrões filogeográficos do gênero *Vriesea* na Mata Atlântica (Palma-Silva *et al.* 2009; Neves *et al.* 2020) e dos padrões históricos desta floresta, revelando estabilidade da porção sul durante o Quaternário, ao contrário do relatado em trabalhos anteriores. Além disso, o Capítulo III da tese mostrou uma alta taxa de hibridação entre as espécies do “grupo das infladas”, sendo que a partir deste trabalho muitos outros estudos poderão ser desenvolvidos, buscando o entendimento de quais barreiras estão sendo menos eficientes ou quais ainda estão ajudando a manter o limite entre estas espécies nas localidades estudadas. Também, sugerimos a investigação da possível origem híbrida de *V. agostiniana*, e mesmo a descrição dos quatro indivíduos (VHP) como uma provável notoespécie, a partir de uma investigação mais aprofundada no que diz respeito a determinação dos possíveis parentais. Considerando as diferentes abordagens dessa tese, ficou evidente a necessidade de conservação do bioma Mata Atlântica, para que o fluxo gênico entre as populações possa ocorrer e que a manutenção do limite entre as espécies fique em equilíbrio.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
(CAPÍTULOS I E IV)

Referências Bibliográficas

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJ, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martinez-Rodriguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfennig K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JB, Zinner D (2013) Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 229–246.
- Aguiar-Melo C, Zanella CM, Goetze M, Palma-Silva C, Hirsch LD, Neves B, Costa AF, Bered F (2019) Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest. *American Journal of Botany* 106(7): 971–983.
- Araujo AC, Fischer EA, Sazima M (1994) Floração sequencial e polinização de três espécies de *Vriesea* (Bromeliaceae) na região de Juréia, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 17(2): 113–118.
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.
- Baack E, Melo MC, Reiseberg LH, Ortiz-Barrientos (2015) The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist* 207: 968–984.
- Barfuss MHJ, Samuel R, Till W, Stuessy TF (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany* 92: 337–351.
- Barfuss MH, Till W, Leme EM, Pinzón JP, Manzanares JM, Halbritter H, Samuel R, Brown GK (2016) Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* 279:1–97.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG, Fernandes-Salomão TM (2010) Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41: 534–547.
- Batalha-Filho H, Miyaki CY (2011) Filogeografia da Mata Atlântica. *Revista da Biologia Vol. Esp. Biogeografia*: 31–34.
- Behling H, Negrelle RRB (2001) Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research* 56: 383–389.
- Benzing DH (2000) Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 690 p.
- Brunes TO, Thomé MTC, Alexandrino J, Haddad CFB, Sequeira F (2015) Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the southern Brazilian Atlantic Forest. *Organisms Diversity and Evolution* 15: 695–710.

- Bünger MO, Mazine FF, Forest F, Bueno ML, Stehmann JR, Lucas EJ (2016) The evolutionary history of *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* (Myrtaceae) corroborates historically stable areas in the southern Atlantic Forest. *Annals of Botany* 118: 1209–1223.
- Buzato S, Sazima M, Sazima I (2000) Hummingbird-Pollinated Floras at Three Atlantic Forest Sites. *Biotropica*, Special Issue: The Brazilian Atlantic Forest 32(4b): 824-841.
- Câmara IG (2003) Brief history of conservation in the Atlantic forest. Em: Galindo-Leal C, Câmara IG (eds) *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook*. Island Press, Washington, DC, pg 31–42.
- Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187–1201.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science* 323: 785–789.
- Castello LV, Chiapella JO, Barfuss MHJ, Till W, Quiroga MP, Premoli AC (2020) Comparative phylogeography, morphological boundaries and climate envelopes of two sympatric widespread Bromeliaceae from the southern Andes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 192: 726–743.
- Costa AF, Rodrigues PJFP, Wanderley MGL (2009) Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 163–181.
- Costa AF, Gomes-da-Silva J, Wanderley MGL (2014) *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomy history, and morphology of the brazilian lineage. *Journal of the Torrey Botanical Society* 141 (4): 338-352.
- Costa AF, Gomes-da-Silva J, Wanderley MGL (2015) *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): a cladistic analyses of eastern Brazilian species based on morphological characters. *Rodriguésia* 66(2): 429-440.
- Costa GC, Hampe A, Ledru MP, Martinez PA, Mazzochini GG, Shepard DB, Werneck FP, Moritz C, Carnaval AC (2018) Biome stability in South America over the last 30 kyr: Inferences from long-term vegetation dynamics and habitat modelling. *Global Ecology and Biogeography* 27: 285–297.
- Cozzolino S, Scopece G (2008) Specificity in pollination and consequences for postmating reproductive isolation in deceptive Mediterranean orchids. *Philosophical transactions of the royal society B*, 363: 3037-3046.
- D'Horta FM, Cabanne GS, Meyer D, Miyaki CY (2011) The genetic effects of the Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1923–1935.
- Dias ML, Prezoto F, Abreu PF, Neto LM (2014) Bromélias e suas principais interações com a fauna. *Ces Revista, Juiz de Fora*, v. 28, n. 1. p. 3-16.

- Flora do Brasil 2020 em construção (Bromeliaceae). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>. (Acesso em: 25/11/2020).
- Flora do Brasil 2020 em construção (*Vriesea*). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6414>. (Acesso em: 04/11/2020).
- Gardner CS (1984) Natural Hybridization in "Tillandsia" subgenus "Tillandsia". *Selbyana* 2/4: 380-393.
- Gilman RT, Behm JE (2011) Hybridization, species collapse, and species reemergence after disturbance to premating mechanisms of reproductive isolation. *Evolution* 65-9: 2592-2605.
- Givnish TJ, Millan KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE, Sytsma KJ (2004) Ancient vicariance or recent long distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American- African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhf* sequence data. *International Journal Plant Science* 165 (4 Suppl.): S35-S54.
- Givnish TJ, Milliam KC, Berry PE e Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23: 3-26.
- Givnish, TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, 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, Sytsma K (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 872-895.
- 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, Evan TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ (2014) Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55–78.
- Goodwillie C, Ness JM (2013) Interactions of hybridization and mating systems: a case study in *Leptosiphon* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany* 100 (6): 1002-1013.
- Goetze M, Palma-Silva C, Zanella CM, Bered F (2016) East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181 (3): 477-490.
- Gomes-da-Silva J, Souza-Chies TT (2017) What actually is *Vriesea*? A total evidence approach in a polyphyletic genus of Tillandsioideae (Bromeliaceae, Poales). *Cladistics* 34 (2):181–199.
- Gonçalves CN, Azevêdo-Golçalves CF (2009) A new hybrid bromeliad from southernmost Brazil, *Tillandsia x baptistana*. *Novon* 19: 353-356.

- Gouda EJ, Butcher D, Gouda CS. [continuously updated]. *Encyclopaedia of Bromeliads, version 4*. University Botanic Gardens, Utrecht. Available at: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> (Acesso em: 25/11/2020).
- Hirsch LD, Zanella CM, Aguiar-Melo C, Costa LMS, Bered F (2020) Interspecific gene flow and an intermediate molecular profile of *Dyckia julianae* (Bromeliaceae), an endemic species from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 192: 675–690.
- Harrison RG, Larson E (2014) Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. *Journal of Heredity* 105(Special Issue):795–809.
- Kartzinel TR, Campbell DA, Trapnell DW (2015) Spatial patterns of haplotype variation in the epiphytic bromeliad *Catopsis nutans*. *Biotropica* 48: 206–217.
- Kessous IM, Couto DR, Uribbe FP, Costa AF (2018) New records of *Vriesea agostiniana* E.Pereira, and *Vriesea saltensis* Leme & L.Kollmann (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from southeastern Brazil. *Check List* 14 (1): 37–41.
- Kessous IM, Neves B, Couto DR, Paixão-Souza B, Pederneiras LC, Moura RL, Barfuss MHJ, Salgueiro F, Costa AF (2020) Historical biogeography of a Brazilian lineage of Tillandsioideae (subtribe Vrieseinae, Bromeliaceae): the Paranaean Sea hypothesized as the main vicariant event. *Botanical Journal of the Linnean Society* 192(4): 625–641.
- Kowalski VK, Tardivo RC (2015) O grupo *Vriesea platynema* Gaudich.(Bromeliaceae, Tillandsioideae) no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia*, 66(2): 465–475.
- Lamont BB, He T, Enright NJ, Krauss SL, Miller BP (2003) Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 551–557.
- Ledru MP, Rousseau DD, Cruz Jr FW, Riccomini C, Karmann I, Martin L (2005) Paleoclimatic changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research* 64: 444–450.
- Leme EM, Halbritter H, Barfuss MHJ (2017) *Waltillia*, a new monotypic genus in Tillandsioideae (Bromeliaceae) arises from a rediscovered, allegedly extinct species from Brazil. *Phytotaxa* 299: 1–35.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH (2008) The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical transactions of The Royal Society B* 363: 3009–3021.
- Machado CG, Semir J (2006) Fenologia da floração e biologia floral de bromeliáceas ornitófilas de uma área da Mata Atlântica do sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 163–174.
- Machado TM, Loiseau O, Paris M, Weigand A, Versieux LM, Stehmann JR, Lexer C, Salamin N (2020) Systematics of *Vriesea* (Bromeliaceae): phylogenetic relationships based on nuclear gene and partial plastome sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 192:656–674.

- Martins FM, Templeton AR, Pavan ACO, Kohlbach BC, Morgante JS (2009) Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 9, 294.
- Martinelli G (1994) Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. Ph.D. dissertation, University of St. Andrews, St. Andrews, Scotland, UK.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzales M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC (2008) Bromeliaceae na Mata Atlântica brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59 (1): 209-258.
- Matallana G, Oliveira PE, Silva PRR, Wendt T (2016) Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181(3): 521–531.
- Matos JZ, Juan A, Agulló JC, Crespo MB (2016) Morphological features, nuclear microsatellites and plastid haplotypes reveal hybridisation processes between two sympatric *Vriesea* species in Brazil (Bromeliaceae). *Phytotaxa* 261 (1): 058–074.
- Melo CA (2016) Filogeografia de cinco espécies de *Dyckia* (Bromeliaceae) endêmicas de uma região do centro-oeste brasileiro, que compreende os biomas Cerrado, Pantanal e Chaco, em comparação com uma congênere amplamente distribuída. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 70 pg.
- Menezes L, Canedo C, Batalha-Filho H, Garda AA, Gehara M, Napoli MF (2016) Multilocus phylogeography of the treefrog *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) reveals Plio Pleistocene diversification in the Atlantic Forest. *PloS One* 11: e0154626.
- Morellato LPC, Haddad CFB (2000) Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786–792.
- Mota MR (2019) Filogeografia do complexo *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 48 pg.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Neri J, Wendt T, Leles B, Santos MF, Palma-Silva C (2017a) Variation in reproductive systems facilitates species boundaries of sympatric *Vriesea* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 184: 272–279.
- Neri J, Wendt T, Palma-Silva C (2017b) Natural hybridization and genetic and morphological variation between two epiphytic bromeliads. *AoB Plants* 10: plx061.
- Neves B, Uribe FP, Jacques SSA, Zanella CM, Costa AF (2018) Species Boundaries in the *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae) Complex after a Broad Morphometric and Taxonomic Study. *Systematic Botany* 43(4):870-888.

- Neves B, Zanella CM, Kessous IM, Uribe FP, Salgueiro F, Bered F, Antonelli A, Bacon CD, Costa AF (2019) Drivers of bromeliad leaf and floral bract variation across a latitudinal gradient in the Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 47:261–274.
- Neves B, Kessous IM, Moura RL, Couto DR, Zanella CM, Antonelli A, Bacon CD, Salgueiro F, Costa AF (2020) Pollinators drive floral evolution in an Atlantic Forest genus. *AoB Plants* 12(5): plaa046.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini (2009) Range-Wide Patterns of Nuclear and Chloroplast DNA Diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical Forest Species. *Heredity* 103: 503-512.
- 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.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY, J. W. Sites Jr JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13–26.
- Peres EA, Sobral-Souza T, Perez MF, Bonatelli IAS, Silva DP, Silva MJ, Solferini VN (2015) Pleistocene niche stability and lineage diversification in the subtropical spider *Araneus omnicolor* (Araneidae). *PloS One* 10: e0121543.
- Ramos FN, Mortara SR, Monalisa-Francisco N, Elias JPC, Neto LM, Freitas L, Kersten R, Amorim AM, Matos FB, Nunes-Freitas AF, Alcantara S, Alexandre MHN, de Almeida-Scabbia RJ, de Almeida OJG, Alves FE, de Oliveira Alves RM, Alvim FS, de Andrade ACS, de Andrade S, Aona LYS, Araujo AC, de Araújo KCT, Ariati V, Assis JC, de Azevedo CO, Barbosa BF, Barbosa DEF, Barbosa FDR, de Barros F, Basilio GA, Bataghin FA, Bered F, Bianchi JS, Blum CT, Boelter CR, Bonnet A, Brancalion PHS, Breier TB, Brion CT, Buzatto CR, Cabral A, Cadorin TJ, Cagliioni E, Canêz L, Cardoso PH, de Carvalho FS, Carvalho RG, Catharino ELM, Ceballos SJ, Cerezini MT, César RG, Cestari C, Chaves CJN, Citadini-Zanette V, Coelho LFM, Coffani-Nunes JV, Colares R, Colletta GD, Corrêa NM, da Costa AF, da Costa GM, Costa LMS, Costa NGS, Couto DR, Cristofolini C, da Cruz ACR, Del Neri LA, di Pasquo M, Dos Santos Dias A, Dias LDCD, Dislich R, Duarte MC, Fabricante JR, Farache FHA, de Faria APG, Faxina C, Ferreira MTM, Fischer E, Fonseca CR, Fontoura T, Francisco TM, Furtado SG, Galetti M, Garbin ML, de Gasper AL, Goetze M, Gomes-da-Silva J, Gonçalves MFA, Gonzaga DR, Silva ACGE, Guaraldo AC, Guarino ESG, Guislon AV, Hudson LB, Jardim JG, Jungbluth P, Kaeser SDS, Kessous IM, Koch NM, Kuniyoshi YS, Labiak PH, Lapate ME, Santos ACL, Leal RLB, Leite FS, Leitman P, Liboni AP, Liebsch D, Lingner DV, Lombardi JA, Lucas E, Luzzi JDR, Mai P, Mania LF, Mantovani W, Maragni AG, Marques MCM, Marquez G, Martins C, Martins LDN, Martins PLSS, Mazziere FFF, Melo CA, de Melo MMF, Mendes AF, Mesacasa L, Morellato LPC, Moreno VS, Muller A, Murakami MMDS, Cecconello E, Nardy C, Nervo MH, Neves B, Nogueira MGC, Nonato FR, de Oliveira-Filho AT, de Oliveira CPL, Overbeck GE, Marcusso GM, Paciencia MLB, Padilha P, Padilha PT, Pereira ACA, Pereira LC, Pereira RAS, Pincheira-Ulbrich J, Pires JSR, Pizo MA, Pôrto KC, Rattis L, Reis JRM, Reis SGD, da RochaPessôa TC, Rocha CFD, Rocha FS, Rodrigues ARP, Rodrigues RR, Rogalski JM, Rosanelli RL, Rossado A, Rossatto DR, Rother DC,

- RuizMiranda CR, Saiter FZ, Sampaio MB, Santana LD, Santos JSD, Sartorello R, Sazima M, Schmitt JL, Schneider G, Schroeder BG, Sevegnani L, Júnior VOS, da Silva FR, da Silva MJ, Silva MPP, Silva RG, Silva SM, Singer RB, Siqueira G, Soares LE, de Sousa HC, Spielmann A, Tonetti VR, Toniato MTZ, Ulguim PSB, van den Berg C, van den Berg E, Varassin IG, da Silva IBV, Vibrans AC, Waechter JL, Weissenberg EW, Windisch PG, Wolowski M, Yañez A, Yoshikawa VN, Zandoná LR, Zanella CM, Zanin EM, Zappi DC, Zipparro VB, Zorzanelli JPF, Ribeiro MC (2019) ATLANTIC EPIPHYTES: a data set of vascular and non-vascular epiphyte plants and lichens from the Atlantic Forest. *Ecology* 100: e02541.
- Reitz R (1983) Bromeliáceas e a Malária-Bromélia Endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Bardosa Rodrigues.
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 28: 359-389.
- Rieseberg LH, Willis JH (2007) Plant speciation. *Science* 317: 910–914.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Ribeiro MC, Martensen AC, Metzger JP, Tabarelli M, Scarano F, Fortin MJ (2011a) The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. Em: FE Zachos, JC Habel, eds. *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*. Berlin, Germany: Springer-Verlag 405–434.
- Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB (2011b) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46–57.
- Ridley M (2007) *Evolução – 3ª edição*. Artmed, Porto Alegre, 752 pg.
- Runemark A, Vallejo-Marin M, Meier JI (2019) Eukaryote hybrid genomes. *PLoS Genet* 15 (11): e1008404.
- 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.
- Silva BG, Piratelli AJ (2014) Foraging behaviour of the Scale-throated Hermit *Phaethornis eurynome* Lesson, 1832 (Aves, Trochilidae) in *Vriesea incurvata* Gaudich (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Biology* 74(2): 311-314.
- Silvestro D, Zizka G, Schulte K (2013) Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution* 68-1: 163-175.
- SOSMA (Fundação SOS Mata Atlântica) / INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) (2020) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2018-2019 - Relatório Técnico, São Paulo.

- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 16: 393-430.
- Smith LB, Downs RJ (1974) Pitcarnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. Hafner Press, New York. Monograph 14, part 1, pg 1-662.
- Smith LB, Downs RJ (1977) Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. Hafner Press, New York. Monograph 14, part 2, pg. 663- 1492.
- Smith LB, Downs RJ (1979) Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*, The New York Botanical Garden Bronx, New York. Monograph 14, part 3, pg 1493-2142.
- Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera Jr FA, Alexandrino J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018–1031.
- Tiffin P, Olson MS, Moyle LC (2001) Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. *Proceedings of the royal society of London B* 268: 861-867.
- Todesco M, Pascual MA, Owens GL, Ostevik KL, Moyers BT, Hübner S, Heredia SM, Hahn MA, Caseys C, Bock CG, Rieseberg LH (2016) Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications* 9: 892–908.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva, C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22: 1193-1213.
- Turchetto-Zolet AC, Salgueiro F, Turchetto C, Cruz F, Veto NM, Barros MJF, Segatto ALA, Freitas LB, Margis R (2016) Phylogeography and ecological niche modelling in *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) suggest distinct vegetational responses to climate change between the southern and northern Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 670–688.
- Uribe FP, Neves B, Jacques, SSA, Costa AF (2020) Morphological variation in the *Vriesea procera* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) in the Brazilian Atlantic Rainforest, with recognition of new taxa. *Systematic Botany* 45: 53–68.
- Vizentin-Bugoni J, Maruyama PK, Sazima M (2014) Processes entangling interactions in communities: forbidden links are more important than abundance in a hummingbird–plant network. *Proceedings of the Royal Society B* 281: 20132397.
- Wendt T, Paz NPL, Rios RI (2000) A morphometric analysis of a putative hybrid between *Pricairnia albiflos* and *P. staminea* (Bromeliaceae). *Selbyana* 21 (1,2): 132-136.
- 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(10): 1760–1767.
- 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.

Wiegand KM (1935) A taxonomist's experience with hybrids in the wild. *Science* 81:161–166.

Zanella CM (2013) Padrões históricos e processos de híbridação entre duas espécies simpátricas de bromélias da Mata Atlântica: Implicações evolutivas e conservacionistas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 127p.

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.