
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MATEUS RIBEIRO MOTA

**ESTUDO DA HIBRIDAÇÃO ENTRE ESPÉCIES
DO GÊNERO *PITCAIRNIA* (BROMELIACEAE)
ATRAVÉS DE MARCADORES PLASTIDIAIS**



Rio Claro
2015

MATEUS RIBEIRO MOTA

ESTUDO DA HIBRIDAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DO GÊNERO
PITCAIRNIA (BROMELIACEAE) ATRAVÉS DE MARCADORES
PLASTIDIAIS

Orientador: Prof^a Dr^a Clarisse Palma da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Rio Claro
2015

584.5 M917 Mota, Mateus Ribeiro
Estudo da hibridação entre espécies do gênero *Pitcairnia*
(Bromeliaceae) através de marcadores plastidiais / Mateus
Ribeiro Mota. - Rio Claro, 2015
45 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Clarisse Palma da Silva

1. Bromélia. 2. Isolamento reprodutivo. 3. Especiação. 4.
Microssatélites. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente aos meus pais Vladimir José Mota e Silvana Ribeiro Mota, por possibilitarem todas as condições emocionais e financeiras para o desenvolvimento da minha vida pessoal e acadêmica; sempre incentivando (e cobrando quando necessário) o cumprimento dos meus objetivos. Sem a confiança que eles depositaram em mim eu não teria conseguido concluir essa importante fase da vida.

Agradeço à minha Orientadora Dr^a Clarisse Palma da Silva por todo o apoio técnico concedido para o desenvolvimento do presente trabalho. Obrigado pela confiança, paciência e amizade depositados em minha pessoa. Sem você esse trabalho nunca teria existido e eu não teria conquistado tanto em tão pouco tempo na minha vida acadêmica.

À Camila Lopes Cavaleiro, por todo o companheirismo, incentivo, apoio, e amor concedido. Sua presença foi fundamental para que eu conseguisse superar as dificuldades que apareceram durante todo esse caminho.

Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Ecologia Molecular, os quais foram de grande ajuda para o desenvolvimento desse trabalho. Especialmente à Carla Haisler Sardelli, técnica do laboratório.

Agradeço a todos os amigos que conquistei durante o período de graduação, especialmente ao pessoal do CBN 2010, que sempre estiveram juntos durante esses anos, tanto dentro da UNESP quanto fora dela.

Agradeço a FAPESP pela bolsa de iniciação científica (processo 2013/12966-7) e pelo financiamento de auxílio (processo 2009/52725-3) concedidos para o desenvolvimento desse projeto, que foram de extrema importância para que eu conseguisse concretizar esse trabalho. Ao CNPq pelo auxílio financeiro (processo 471775/2010-0).

E por fim agradeço a todos que de alguma forma participaram dessa fase da minha vida e que foram relevantes no meu desenvolvimento pessoal e/ou profissional.

RESUMO

Dentre grande variedade de plantas vasculares encontradas na Floresta Atlântica, destacam-se as bromélias (família Bromeliaceae) como plantas com extensa radiação adaptativa no Neotrópico; que ocupam uma ampla diversidade de habitat. Por esta razão, as bromélias têm atraído o interesse de ecologistas moleculares e evolutivos, principalmente focados nas que ocorrem em afloramentos rochosos (inselbergs). Essas representam casos extremos para a compreensão do papel do fluxo gênico durante os processos de especiação em ambientes naturalmente fragmentados. *Pitcairnia flammea* ocorre em inselbergs ao longo da Floresta Atlântica de Santa Catarina ao Espírito Santo. *Pitcairnia corcovadensis* são ervas raras encontradas em pequenas populações isoladas em algumas localidades no estado do Rio de Janeiro, ocorrendo em simpatria com *P. flammea*. Estudos anteriores mostraram que essas espécies podem hibridar através de polinização interespecífica manual e que os híbridos são viáveis e férteis. O objetivo deste trabalho foi testar hipóteses sobre os processos evolutivos envolvidos na diferenciação populacional e na coesão das espécies, tais como introgressão, hibridização e deriva genética; descrevendo a estrutura genética de populações simpátricas de *P. flammea* e *P. corcovadensis* e alopátricas de *P. flammea*. Para podermos distinguir entre polimorfismo ancestral ou hibridização/introgressão recente, e explorar os padrões e as consequências do fluxo gênico interespecífico entre diferente espécies de *Pitcairnia*, neste trabalho foram utilizados marcadores plátidiais e nucleares do tipo microssatélites. As análises Bayesianas implementadas indicaram que ambas as zonas híbridas analisadas (Teresópolis e Corcovado) apresentaram indivíduos híbridos, porém não foram observados evidências de introgressão. A alta estruturação e diferenciação genética encontrada entre as populações de ambas as espécies indicam a baixa ocorrência de fluxo gênico intraespecífico e um forte isolamento geográfico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.	5
1.1. Especiação e a evolução do isolamento reprodutivo.	5
1.2. Especiação e hibridação.	6
1.3. A família Bromeliaceae.	8
1.4. O gênero <i>Pitcairnia</i>	8
1.5. <i>Pitcairnia flammea</i> e <i>Pitcairnia corcovadensis</i>	9
1.6. Marcadores moleculares no estudo da especiação.	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.	13
2.1. Amostragem e áreas estudadas	13
2.2. Extração do DNA.	16
2.3. Amplificação e genotipagem.	16
2.4. Análise dos dados.	18
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO	36
6. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Especiação e a evolução do isolamento reprodutivo

O processo de especiação pode ser caracterizado pela evolução do isolamento reprodutivo entre dois grupos de organismos (Lowry et al., 2008). Para se compreender o fluxo gênico interespecífico e os padrões de isolamento reprodutivo, é necessário também entender os tipos de barreiras que podem impedir o fluxo gênico. Barton (1985) já havia colocado que o fluxo gênico pode ser impedido de três formas: (1) devido à baixa aptidão dos híbridos ou parentais, sendo esse fenômeno mais importante quando o tamanho da população é sensível a aptidão (Wallace, 1975); (2) ao fluxo gênico impedido por associações entre alelos, pois a seleção é mais eficaz quando espalhada ao longo de muitos loci do que quando está concentrada em apenas um locus; e (3) devido à fatores ambientais que podem afetar a densidade ou a dispersão das espécies.

Barreiras para o isolamento reprodutivo são os caracteres evolutivos que impedem duas espécies de intercruzarem. A principal distinção entre os mais variados mecanismos de isolamento é entre barreiras pré-cruzamento e pós-cruzamento (Coyne; Orr, 2004). Mecanismos pré-cruzamento evitam a fertilização, ou seja, não ocorre a troca de gametas e o zigoto nunca é formado, seja por motivos comportamentais ou ecológicos, por exemplo: porque os membros das duas espécies são adaptados a diferentes habitats e nunca se encontram. Já as barreiras pós-cruzamento ocorrem quando as barreiras pré-cruzamento são fracas ou ausentes; atuando depois que ocorre a troca de gametas. Nesse caso os mecanismos de isolamento podem ser pré-zigóticos ou pós-zigóticos (Coyne; Orr, 2004; Ridley, 2003). Barreiras pré-zigótica impedem a formação do zigoto após o cruzamento, por exemplo, quando o pólen e o estigma de diferentes espécies não se reconhecem. Já os mecanismos pós-zigóticos reduzem a viabilidade ou a aptidão do híbrido, por exemplo, quando os membros de duas espécies podem se encontrar, intercruzar e formar zigotos, mas as descendências híbridas são inviáveis ou estéreis, sem ocorrência de fluxo gênico entre as espécies (Rieseberg; Carney 1998; Ridley, 2003; Turelli et al., 2001).

Investigar como o isolamento reprodutivo se desenvolve entre espécies e determinar a importância relativa dos diferentes tipos de barreira de isolamento é fundamental para se compreender o processo de especiação (Lowry, 2008). Biólogos evolucionistas de plantas recentemente fizeram grandes progressos em quantificar o conjunto de barreiras de isolamento reprodutivo em vários tipos de plantas (Lowry, 2008). Chari e Wilson (2001) estudaram os fatores que geravam isolamento reprodutivo entre duas espécies de *Penstemon* (Scrophulariaceae), onde foram encontradas várias barreiras, como polinizadores específicos e crescimento reduzido do tubo polínico. Ramsey et al. (2003) dirigiu um estudo para revelar os componentes do isolamento reprodutivo entre duas espécies de *Mimulus* (Phrymaceae), e chegou à conclusão que fatores ecológicos resultantes da divergência adaptativa são as barreiras primárias, com o isolamento reprodutivo ocorrendo antes da formação de híbridos. Scopece et al. (2013) estudou duas espécies de *Orchis* (Orchidaceae) a fim de compreender a contribuição e a força dos mecanismos de isolamento reprodutivo entre as espécies, e concluiu que nenhuma das barreiras estudadas foram capazes de impedir completamente o fluxo gênico, mas que múltiplas barreiras em conjunto contribuem para a manutenção da integridade da espécie. Runquist et al. (2014) estudou a evolução do isolamento reprodutivo entre duas espécies do gênero *Clarkia* (Onagraceae), caracterizando as barreiras pré e pós-zigóticas e a força de isolamento das mesmas.

1.2. Especiação e hibridação

O conhecimento sobre hibridização e padrões de fluxo gênico interespecífico são importantes para a compreensão: 1) dos processos de especiação; 2) dos movimentos de genes através das fronteiras das espécies e populações, 3) da manutenção da coesão das espécies (Seehausen, 2004).

O fluxo gênico interespecífico é responsável por um importante fenômeno: introgressão. A introgressão é o fluxo de alelos de uma espécie ou população para outra, de forma que os híbridos formados apresentam uma mistura de alelos de ambas as espécies parentais (Freeland, 2009). A hibridação natural e introgressão são fatores que desempenham um papel relevante na evolução das plantas, sendo responsável por grande parte da

diversificação em angiospermas (Ellstrand et al. 1996; Rieseberg; Carney, 1998; Stebbins, 1959).

Regiões onde acontece fluxo gênico interespecífico são chamadas de zonas híbridas, onde populações distintas se encontram, inter cruzam e produzem uma prole híbrida; as quais são compostas por uma ampla variedade de genótipos, resultado de um longo tempo de recombinação gênica entre as espécies (Barton, 1985; Lexer, 2005). Esses processos de hibridação e suas consequências podem ser estudados pela avaliação da arquitetura genética dessas zonas (Rieseberg et al, 1999).

Zonas híbridas têm sido relatadas em plantas e estão associadas às áreas onde populações antes isoladas entraram novamente em contato, servindo como laboratórios naturais, onde os híbridos podem atuar como pontes para a troca de genes entre populações (Lexer et al, 2005; Moccia et al, 2007). Trabalhos anteriormente publicados têm revelado a existência de fluxo gênico interespecífico e hibridação em outras famílias de plantas. Burgarella et al. (2009) realizou estudo para detectar a ocorrência de híbridos naturais entre duas espécies de carvalho: *Quercus suber* e *Q. ilex* (Fagaceae). Esse trabalho revelou pela primeira vez a existência de híbridos entre *Q. suber* e *Q. ilex* e a ocorrência de uma baixa taxa de fluxo gênico entre as espécies. Estudos com espécies de orquídeas demonstraram hibridação e introgressão mesmo entre espécies com ploidias diferentes (*Epidendrum fulgens* e *E. puniceoluteum*, Pinheiro et al. 2010). Segatto et al. (2013) mostrou a existência de hibridação natural em espécies do gênero *Petunia* (Solanaceae).

Em bromélias, embora muitas espécies hibridizem facilmente em cultivo, existem poucos registros de híbridos naturais entre espécies simpátricas proximamente relacionadas. Estudos recentes desenvolvidos por Palma-Silva et al (2011) revelaram o fluxo gênico interespecífico em espécies de bromélias do gênero *Pitcairnia* e evidenciaram o compartilhamento do genoma plastidial entre espécies de *P. flammea*, *P. corcovadensis* e *P. albiflos*. Além disso, Rôças et al (2004) ao realizar experimentos de cruzamento manual observou hibridação artificial entre *P. flammea* e *P. corcovadensis*, inclusive com a formação de frutos e a presença de sementes viáveis nos retrocruzamentos entre híbridos e as espécies parentais.

1.3. A Família Bromeliaceae

Bromeliaceae é uma família de monocotiledôneas que sofreram uma extensa radiação adaptativa, distribuindo-se por todas as Américas, principalmente na região Neotropical (Benzing, 2000). Com base em estudos filogenéticos, atualmente, oito subfamílias são reconhecidas: Brocchioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae (Givnish et al., 2007, 2011). A maioria das plantas da família Bromeliaceae são polinizadas por vertebrados, especialmente beija-flores e morcegos (Araújo et al., 1994; Sazima et al., 1989). As sementes variam de tamanho, indo do médio ao pequeno quando comparada com outras angiospermas, e o modo de dispersão também é variado; podendo ser realizado por uma fauna diversificada, vento, gravidade e até mesmo água (Benzing, 2000).

Espécies de bromélias destacam-se por ocorrerem em ambientes bastante diversificados. Podem ser encontradas tanto em ambientes áridos e pobres em nutrientes, como em ambientes úmidos e ricos em nutrientes, além de ocuparem altitudes indo do nível do mar até cerca 4 mil metros (Leme; Marigo, 1993). Espécies dessa família que ocorrem em regiões montanhosas, por exemplo, têm atraído o interesse de ecologistas moleculares e biólogos evolutivos, e representam interessantes modelos, para estudar o papel do fluxo gênico na coesão de espécies e na especiação em ambientes naturalmente fragmentados (Barbará et al., 2007; Boisselier-Dubayle et al., 2010; Sarthou et al., 2001; Palma-Silva et al. 2011). Inselbergs são afloramentos rochosos isolados que se erguem a partir da matriz florestal circundante e são considerados ilhas de habitats terrestres por conta do isolamento espacial e ecológico, o que fornece uma barreira contra a dispersão e migração (Porembski, 2007).

1.4. O gênero *Pitcairnia*

A subfamília Pitcairnioideae possui 5 gêneros, sendo *Pitcairnia* o maior gênero, com 391 espécies (The Plant List 2010; Forzza et al. 2012). Embora basicamente terrestres, Pitcairnioideae podem ser encontradas nos mais variados tipos de solos e, muitas vezes, substratos menos acomodatórios como

penhascos íngremes (Benzing, 2000). No Brasil, as 54 espécies atualmente descritas de *Pitcairnia* constituem três grupos geográficos distintos na Amazônia (18 spp.), nos campos rupestres do Cerrado da região central do Brasil (13 spp.) e nos afloramentos rochosos da Floresta Atlântica (23 spp.) (Forzza et al., 2012; Wendt; Chamas, 1997).

Pitcairnia caracteriza-se por abrigar ervas terrestres, rupícolas ou mais raramente epífitas. As inflorescências são espigas, racemos ou panículas. As flores são monoclinas, longo-pedicelada a sésseis, secundariamente zigomorfa pela torção das pétalas. O fruto é uma cápsula com deiscência septícida ou loculícida. As sementes são numerosas, lineares e bicaudadas ou ovaladas e aladas ou raramente sem apêndices (Benzing, 2000; Saraiva, 2013).

1.5. *Pitcairnia flammea* e *Pitcairnia corcovadensis*

Pitcairnia flammea ocorre em inselbergs ao longo da Floresta Atlântica da Bahia a Santa Catarina, sendo uma das espécies de *Pitcairnia* com maior variação morfológica (Wendt; Chamas, 1997). Esta espécie ocorre em simpatria com *P. corcovadensis* e *P. albiflos* na cidade do Rio de Janeiro, em simpatria com *Pitcairnia* sp. (identificação ao nível específico ainda desconhecido) no estado de São Paulo e em simpatria com *P. curvidens* em Ibitipoca, Minas Gerais (Monteiro; Forzza, 2008). *Pitcairnia corcovadensis* são ervas raras encontradas em pequenas populações isoladas em algumas localidades no estado do Rio de Janeiro. *Pitcairnia corcovadensis* já foi considerada uma variedade de *P. flammea*, mas recentemente foi reestabelecida como uma espécie, baseado no fato de que ocorre simpatricamente com *P. flammea* e é morfologicamente distinta (Wendt et al., 2000, 2002). Wendt et al. (2000, 2002) e Rôças et al. (2004) mostraram que *P. flammea* e *P. corcovadensis* podem hibridar artificialmente e que os híbridos produzidos são viáveis e férteis e capazes de retrocuzar com as espécies parentais.

A biologia reprodutiva da maioria das espécies de *Pitcairnia* é desconhecida, porém estudos realizados por Wendt et al (2002) revelaram que *P. flammea* e *P. corcovadensis* são autocompatíveis e capazes de autopolinização. *P. flammea* é possivelmente polinizada por beija-flores,

abelhas e pelo vento; e *P. corcovadensis* se utiliza principalmente da autopolinização, recebendo menor número de visitantes florais. *Pitcairnia flammea* e *P. corcovadensis* apresentam flores vermelhas e ambas são hermafroditas. O perianto é diclamídeo, e consiste de três sépalas e três pétalas livres gratuitos, presos juntos, formando uma corola semelhante a um tubo. Cada um tem seis estames e gineceu um pistilo. O ovário de ambas as espécies é semi-inferior com três lóculos (Wendt et al, 2002).

O período de floração da maioria das espécies de *Pitcairnia* costuma ocorrer de novembro a abril, com variações temporais dentro das espécies (Smith; Downs, 1974). Wendt et al. (2002) encontrou em estudos realizados no Morro do Corcovado um período de floração ocorrendo de final de Janeiro até Junho. Os períodos de floração de *P. flammea* e *P. corcovadensis* são divergentes, com uma pequena sobreposição entre eles: de meados de Março até meados de Abril em *P. corcovadensis* (Wendt et al., 2002) e de Abril até meados de Maio para *P. flammea* (Wendt et al., 2002; Rocha-Pessôa e Rocha, 2008).

1.6. Marcadores Moleculares no estudo da especiação

A aplicação de técnicas moleculares tem proporcionado, além do levantamento de espécies, o conhecimento da variabilidade genética dentro e entre populações (Avice, 1994), a análise da genética de espécies em perigo de extinção e a investigação da história evolutiva de populações (Eizirik, 1996). Dessa forma a genética molecular aplicada à ecologia tem se tornado uma excelente ferramenta, amplamente utilizada em pesquisas que visam compreender melhor a diversificação e especiação de espécies e linhagens (Eizirik, 1996; Oliveira et al., 2006).

Os estudos de diversidade genética podem ser realizados através de marcadores moleculares, os quais podem esclarecer padrões evolutivos tanto de espécies quanto de populações. Marcadores moleculares representam uma ferramenta poderosa no estudo da hibridação, uma vez que são capazes de detectar até mesmo baixos níveis de introgressão (Lexer, 2005; Zanella, 2013) e podem carregar consigo o registro de processos evolutivos, como fragmentação geográfica e processos de dispersão (Kalinowski, 2004).

Microssatélites ou SSR (*“simple sequence repeat”*) são marcadores moleculares codominantes e espécie-específico (Zanella, 2013), composto por sequências de nucleotídeos repetidos, normalmente com 1 a 6 pares de base, presentes tanto no genoma nuclear quanto no genoma plastidial. Apresentam uma taxa mutacional maior do que a maioria dos outros tipos de sequência, por conta disso, não são muito úteis para estudos evolutivos de eventos que ocorreram em um passado relativamente distante (Freeland, 2009). Por outro lado, essa alta taxa de mutação o torna ideal para análises de eventos relativamente recentes, por conta do alto grau de polimorfismo (Freeland, 2009).

Embora originalmente concebido para a pesquisa em seres humanos, análises com microssatélites tornaram-se uma ferramenta poderosa para a pesquisa em animais e plantas (Dayanandan et al., 1997; Oliveira et al., 2006; Schlötterer et al., 1991). Esta ampla utilização decorre da elevada diversidade de alelos encontrados nos loci de microssatélites, da codominância dos alelos, e da relativamente simples amplificação em reação em cadeia da polimerase (PCR) – (Dayanandan et al., 1997). A PCR é um método *in vitro* de síntese e amplificação de uma sequência específica de DNA que se tornou um pilar fundamental para a genética e análises moleculares. O método baseia-se em ciclos térmicos, que consiste de ciclos de aquecimento e de arrefecimento da reação para a replicação do DNA (Erich, 1989; Sambrook, 2001). O uso de um par de oligonucleotídeos (*primers*) sintetizados especialmente para a sequência de DNA desejada permite uma alta especificidade durante a reação de amplificação, tornando a PCR um método simples, robusto, rápido e flexível (Erich, 1989; Sambrook, 2001). Esses marcadores podem ser utilizados para ajudar a resolver problemas que variam desde a taxonomia, questões relacionadas à paternidade, à estrutura genética de populações e padrões de hibridação (McDonald e Potts, 1997; Boneh et al., 2003). Além disso, os cloroplastos apresentam o genoma conservado, com baixas taxas de mutação, sendo essas causadas principalmente no tamanho de sequências repetitivas, ao invés de recombinações na sequência (Freeland, 2009).

O cloroplasto é uma organela presente em células vegetais e o responsável pela fotossíntese, realizado através da clorofila, o pigmento

responsável pela cor verde (Raven, 2007). Em angiospermas, na maioria dos casos, o DNA presente nos cloroplastos (cpDNA) se apresenta de forma circular, é muito menor que o DNA nuclear e tem herança maternal. Considerando a baixa taxa de variabilidade dos cloroplastos, as sequências que flanqueiam os microssatélites tendem a ser conservadas dentro da mesma espécie, assim muitos *primers* desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados entre as espécies do mesmo gênero (Oliveira, 2006).

Os objetivos desse trabalho foram:

(1) avaliar estrutura genética do genoma plastidial e nuclear em populações simpátricas e alopátricas *P. flammea* e *P. corcovadensis*;

(2) investigar a ocorrência de hibridação e introgressão entre *P. flammea* e *P. corcovadensis* e verificar a intensidade e a direção do fluxo gênico interespecífico;

(3) investigar a intensidade e a relativa importância dos mecanismos ecológicos (pré-cruzamento) e genéticos (pós-cruzamento) que atuam no isolamento reprodutivo e na manutenção destas zonas híbridas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem e áreas estudadas

No presente trabalho foram utilizadas duas espécies do gênero *Pitcairnia*: *Pitcairnia flammea* e *P. corcovadensis*. Foram coletados indivíduos em duas populações em que ambas as espécies ocorrem em simpatria no Estado do Rio de Janeiro: 1) Teresópolis (Parque Nacional da Serra dos Órgãos) e 2) Corcovado (Parque Nacional da Tijuca). Além disso, foram coletados indivíduos de duas populações alopátricas de *P. flammea* para serem utilizados como referência; 1) Paraty, RJ (Parque Nacional da Serra do Mar) e 2) Picinguaba, SP (Parque Estadual da Serra do Mar). Até o momento não são conhecidas populações alopátricas de *P. corcovadensis*.

Tanto as populações simpátricas como as alopátricas estão distribuídas no domínio da Floresta Atlântica. Nas duas possíveis zonas híbridas, foram coletados indivíduos de *P. flammea*, *P. corcovadensis* e de possíveis híbridos entre ambas. Em Teresópolis foram amostrados 44 (E1) indivíduos e no Corcovado (CO) 64 indivíduos. Nas zonas alopátricas foram amostrados 16 indivíduos em Paraty (PAP) e 22 indivíduos em Picinguaba (PI) (Tabela 1).

A Floresta Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que originalmente estendia-se ao longo da costa brasileira, penetrando até o leste do Paraguai e nordeste da Argentina em sua porção sul (Fundação SOS Mata Atlântica; INPE, 2002). Hoje é considerada uma das grandes prioridades para a conservação da biodiversidade em todo o continente americano, sendo um dos cinco “hotspots” de biodiversidade mais importantes da Terra e a maior Reserva da Biosfera designada pela UNESCO. Devido ao grande desmatamento que vem sofrendo ao longo da história, hoje a Floresta Atlântica está reduzida a cerca de 7,6% da área original (Brito et al, 2006; Mittermeier et al., 2004).

Mesmo com o elevado nível de devastação, a Floresta Atlântica abriga um alto número de espécies endêmicas, representando uma parcela significativa de diversidade biológica do Brasil e da América do Sul (Mittermeier et al., 2004). É estimado que o bioma possua aproximadamente 20.000 espécies de plantas vasculares, como raras espécies de palmeiras, orquídeas

e bromélias (Mitter meier et al., 2004). Devido à alta diversidade, a Floresta Atlântica torna-se um local ideal para se estudar os processos de formação de novas espécies.

Localizado na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, o município de Teresópolis ocupa uma área de 772,4 km², com 871 metros de altitude. O Parque Nacional da Serra dos Órgãos (22°24'S; 42°69'O) compreende uma área de 20 mil hectares, abrangendo os municípios de Guapimirim, Magé, Petrópolis e Teresópolis (Guimarães; Arlé, 1984; ICMBio, 2008). O parque representa um fragmento de Floresta Atlântica com floresta pluvial tropical e campos de altitude, onde as fisionomias vegetais variam conforme a altitude. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é dos tipos Cfb, (mesotérmico) e Cwb, (tropical de altitude) A temperatura média anual varia de 13° a 23° C, com pluviosidade média anual variando de 1500 a 3000 mm, com distribuição sazonal (ICMBio, 2008).

O morro do Corcovado está localizado no Parque Nacional da Tijuca (22°57'S; 43°14'O), na cidade do Rio de Janeiro. O clima da região é caracterizado por ser quente e úmido (clima tropical litorâneo). Com cerca de 3.953 hectares de área, é uma floresta secundária em estado avançado de regeneração, pois no passado a ocupação humana destruiu as Florestas para extração de madeiras e atividades agrícolas, principalmente cultura de cana-de-açúcar e café; representando assim um dos pequenos fragmentos ainda existentes de Floresta Atlântica (Costa; Yano, 1988).

Localizado no litoral sul do Estado do Rio de Janeiro, fazendo divisa com o litoral norte do Estado de São Paulo, o município de Paraty está situado em uma região de sobreposição do Parque Nacional da Serra da Bocaina com o Parque Estadual da Serra do Mar (22°40' e 23°20'S e 44° 24'e 44°54'O) - (Brito et al, 2008).

Tabela 1 - Nome das populações, localidades, coordenadas geográficas, altitude e número de amostras de *Pitcairnia*. Indivíduos híbridos foram classificados com base no coeficiente de mistura revelado pelo STRUCTURE (ver resultados para detalhes).

Populações/Espécie (Cód.)	GPS	Altitude	Nº de amostras	
			Nuclear	Plastidial
Teresópolis - RJ				
<i>Pitcairniaflammea</i> (E1FL)			31	29
<i>Pitcairniacorcovadensis</i> (E1CO)	S22 28.826 W42 59.937	740 m	12	10
Híbridos (E1HB)			1	1
Corcovado – RJ				
<i>Pitcairniaflammea</i> (RJFL)			21	20
<i>Pitcairniacorcovadensis</i> (RJCO)	S22 56.976 W43 13.356	530 m	31	17
Híbridos (RJHB)			12	9
Paraty – RJ				
<i>Pitcairniaflammea</i> (PAP)	S23 13.366 W44 37.595	22 m	16	16
Picinguaba – SP				
<i>Pitcairniaflammea</i> (PI)	S23 19.908 W44 52.831	20 m	22	15

O Núcleo de Desenvolvimento Picinguaba (NDP) localiza-se no litoral norte do Estado de São Paulo, fazendo parte do município de Ubatuba (23°22' S e 44°48' O). O Parque abriga diversos ecossistemas, com a altitude variando de 0 a 1.300 m (Cesar & Monteiro 1995), sendo o Núcleo Picinguaba um dos únicos trechos do Parque Estadual da Serra do Mar que atinge o nível do mar (Bencke; Morellato, 2002; Sistema Ambiental Paulista, 2014). O clima da região é tropical chuvoso, apresentando uma estação superúmida de outubro a abril e uma estação menos úmida de maio a setembro (Morellato et al. 2000). A precipitação média anual é de 2.100 mm e a temperatura média anual é cerca de 22 °C (Bencke; Morellato, 2002).

De cada indivíduo foi retido uma amostra de folha que foi desidratada e mantida em sílica gel, às quais foram levadas ao Laboratório de Ecologia Molecular, no Departamento de Ecologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro; onde então foram transferidas para tubos *ependorff* e armazenadas em freezer -20°C até o momento da extração do DNA.

Todos os indivíduos amostrados foram georreferenciados com o auxílio de GPS. Além disso, materiais testemunho foram depositados no herbário Rioclarense (HRCB).

2.2. Extração do DNA

O DNA genômico total das amostras coletadas foram extraídos a partir das folhas desidratadas seguindo os procedimentos do protocolo de extração modificado de Doyle e Doyle (1990). As primeiras extrações foram realizadas como teste, para garantia de que o protocolo apresentaria eficiência. Após resultados insatisfatórios as amostras passaram a ser extraídas utilizando o DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen). O DNeasy 96 Plant Kit fornece um procedimento mais rápido e mais fácil para o alto rendimento de purificação do DNA total (genômico, cloroplastos, e mitocondrial) a partir de tecido foliar da planta. O procedimento não requer a utilização de fenol, clorofórmio ou um álcool de precipitação, assim gerando baixos riscos a saúde do manipulador (Qiagen, 2002).

A quantificação do DNA total foi realizada através de eletroforese, com visualização em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X; pré-corado com *Gel Red* e quantificados através do marcador *ladder* 100pb.

2.3. Amplificação e genotipagem

Neste trabalho foram utilizados marcadores de microssatélites nucleares e plastidiais. Para amplificação dos locos de microssatélite nucleares foram utilizados dez locos (Tabela 2) previamente desenhados para outras espécies do gênero *Pitcairnia* e outros gêneros de bromélias (E6B: Boneh et al. 2003; PaA05, PaA09, PaA10, PaC05, PaD07, PaB12: Paggi et al. 2008; VgA04: Palma-Silva et al. 2007; ngFos22: Wöhrmann et al. 2012; Acom12.12: Wöhrmann; Weising, 2011). Para amplificação dos microssatélites plastidiais foram utilizadas nove regiões (Tabela 3) também previamente publicadas para outras espécies de bromélias (Palma-Silva et al. 2009; 2011). Dos nove *primers* testados apenas cinco apresentaram resultados satisfatórios, com amplificação boa e polimorfismo; dessa forma cinco regiões foram utilizadas nas análises (PaCP01, PaCP02, PaCP03, PaCP04: Palma-Silva et al., 2011 e VgCP04: Palma-Silva et al., 2009).

Tabela 2 - *Primers* universais de microssatélites nucleares utilizados na amplificação. F = forward, R = reverse.

Primer	Tamanho	Sequências	Cauda
E6B	140-190	F: 5' – AAA CTA TGG ATT CCC CAA CT - 3' R: 5' – CGG TTC CTC CTT AGT CTT TT -3'	FAN
PaA05	270-300	F: 5' – ACC GGG TTC AGG GAA AAT AC - 3' R: 5' – TTG AGG CTA AGA GCG AGG AG - 3'	FAN
PaA10	157-180	F: 5' – AAC CAT TGA CAT CCG CTG TT - 3' R: 5' – CTT CGG AAG CTC CTC TGG AT - 3'	PET
VgA04	187-215	F: 5' – CAA ACC CTT CTC ACC TCA CC -3' R: 5' – CGA CTC ACC TGG CCC TAA T - 3'	VIC
PaC05	160-180	F: 5' – TCG ATG TCG ACG GTA GTG AG - 3' R: 5' – TCC TCT CGC TTT GAT TCA CC - 3'	VIC
PaD07	250-270	F: 5' – TCC ATG TGC CTC ATC ATA GC - 3' R: 5' – TGC CCA CAA AGC ATA TCA GT - 3'	PET
PaA09	200-220	F: 5' – AGA AGA GAA CCC ACC CCA AG - 3' R: 5' – GTG TTC CGC GAC ACT ACA AA - 3'	NED
ngFos22	206-219	F: 5' –GGATGTTAGTCATGAGCAGAG - 3' R: 5' – TCT ACA GCT GAT TCC TCT TTG - 3'	VIC
PaB12	234-278	F: 5' - CCC GAG GGA CAT TCT CTC TT - 3' R: 5' – CAT GGC GCA GTA GTG TTT TC - 3'	NED
Ac12.12	220-240	F: 5' – TAG AGG TCG GGA GAA CGA AA - 3' R: 5' - GCG GAG GCT ACT GAT GCT AC - 3'	PET

Os *primers forward* foram sintetizados com uma cauda M13 de 19 pares de base (5' - CACGACGTTGTAAAACGAC - 3') na extremidade 5' segundo Schuelke (2000). As amplificações dos fragmentos de microssatélites foram feitas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com volume de reação final de 10 µl, utilizando 5 ng/µl da amostra de DNA, 2,5 µl de *Nuclease-Free* H₂O, 5x GoTaq® Colorless Master Mix da Promega, 10 pmol de *forward primers* e 10 pmol de *reverse primers* específicos, e 1 pmol de *primers* M13 universais com fluorocromos distintos (FAM, NED, VIC, PET – AppliedBiosystems). Todas as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas usando o termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (AppliedBiosystems), seguindo os protocolos descritos por Palma-Silva et al. (2007).

Tabela 3 - *Primers* universais de microssatélites plastidiais utilizados na amplificação. F = forward, R = reverse.

Primer	Região	Tamanho	Sequências	Cauda
PaCP01	rps16_trnK B	196	F: 5' – M13-TTG CCT TGC TGC ATT TAC TC - 3' R: 5' – CGT TGA ACT AGC AAC ACA TCG - 3'	FAN
PaCP02	trnDT_F	140	F: 5' – M13-TGC ATA GGA GTT CAT TCA GG A -3' R: 5' – GGG CCT GTC TTG AAA CAA TTT A -3'	VIC
PaCP03	psbA-trnH pit	175	F: 5' – M13-CAG ATG CCC GAG ACC AAG TTA - 3' R: 5' – TCG AGA TAT TGG ACA TAG AAT GC - 3'	NED
PaCP04	rpl16	222	F: 5' – M13-CCA AGT AAT GGC TTT TAT TGA T - 3' R: 5' – GCC CGC GAA ACC TTT ATT TA - 3'	PET
PaCP05	trnLT	111	F: 5' – M13-TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC - 3' R: 5' – GAA AAT AGC AGC CTT TTC GAT - 3'	VIC
PaCP06	trnT_rps4	102	F: 5' – M13-ATC AAA CGG AGCCT CAA CTT 3' R: 5' - GCAAAATCG ACT GAT ACT GAT G -3'	FAN
PaCP07	prs16_trnK A	134	F: 5' – M13-GGT GCT CAA CCT ACA GGA AC T-3' R: 5' - ACT AGT TAC CCT TCC CCA CTT T -3'	NED
PaCP08	rpl32_trnL A2	230	F: 5' – M13-GGT AGT ATC GTC GTG GGT TTT T - 3' R: 5' – TTG AAT CCA TGA AAT CGG ATA A- 3'	FAN
VgCP04	PetG	188	F: 5' – M13-ACC TAC GAC ATC GGG TTT TG 3' R: 5' – TTC TCC TAT GGG CAG TAA CGA - 3'	PET

As genotipagens dos produtos de amplificação dos microssatélites nucleares e plastidiais foram realizadas em sequenciador automático de DNA ABI 3500 (AppliedBiosystems). Os loci foram analisados visualmente no programa GENEMARKER v. 1.95 Demos (SoftGenetics, StateCollege, Pennsylvania, USA), dimensionados contra um padrão de tamanho molecular GeneScan LIZ 500 (AppliedBiosystems).

2.4. Análise dos dados

A caracterização dos loci e os níveis de diversidade gênica foram descritos através dos cálculos de: número de alelos por locus (A), riqueza alélica (A_r), alelos exclusivos (A_e), heterozigose observada (H_o), heterozigose

esperada (H_e) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). O programa MSANALYSER v.4.05 (Dieringer; Schlötterer, 2003) foi utilizado para calcular esses parâmetros. O software GENEPOP *on web* (Raymond; Rousset, 1995) foi utilizado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada locus dentro de cada espécie e híbridos.

As medidas de estrutura populacionais mais utilizadas são as estatísticas F que utiliza coeficiente de endocruzamento para descrever a partição da variação genética dentro e entre populações (Wright, 1931; 1951). Nesse trabalho foram utilizadas as seguintes estatísticas F : F_{IT} , que mede a heterozigosidade de um indivíduo em relação ao total da população; F_{ST} , que estima a diferenciação genética entre subpopulações e mede o grau de isolamento das mesmas; e F_{IS} , que mede o grau de endocruzamento observado em populações (McManus et al., 2011).

As análises Bayesianas foram implementadas no programa STRUCTURE v. 2.3.3 (Hubisz et al., 2009) a fim de se identificar primeiramente os indivíduos como *P. flammea* puro, *P. corcovadensis* puro ou híbridos entre *P. flammea* e *P. corcovadensis*; e posteriormente para estimar a estrutura genética populacional, atribuir grupos genéticos aos indivíduos (K) e definir a proporção de mistura dos indivíduos (Q). Foi utilizado o limiar de $q > 0,90$ para *P. corcovadensis* e $q < 0,10$ para *P. flammea* segundo Palma-Silva et al (2011). Os indivíduos que ficaram entre esses valores foram considerados híbridos. O número de K foi definido a partir de um mínimo de 1 até um máximo de 6, e simulações foram executados para cada valor com um *burn in* de 250.000 por 1.000.000 de replicações. Os números de agrupamentos ótimo (K) foram definidos segundo Evanno et al. (2005), utilizando o programa STRUCTURE-HARVESTER v.0.6.94 (Earl; von Holdt, 2011).

Complementarmente foram feitas análises Bayesianas para as zonas híbridas no programa NEWHYBRIDS versão 1.1 beta (Anderson & Thompson, 2002). Esse programa foi utilizado para classificar os indivíduos em classes genotípicas: parentais puros, F1, F2 e retrocruzamentos em ambas as direções, utilizando um valor de limiar de $q = 0,90$. As análises foram realizadas separadamente para cada zona híbrida.

Com os resultados dos marcadores plastidiais as variantes genéticas de todas as regiões de microssatélites plastidiais foram combinados em haplótipos. Uma rede de haplótipos median-joining (Bandelt et al. 1999) foi construída baseada nos haplótipos de microssatélite plastidiais, utilizando o programa NETWORK 4.5.1.6. (<http://www.fluxus-engineering.com>) seguindo os procedimentos descritos por Palma-Silva et al (2011). Em sequência, cada população foi caracterizada para o nível de diversidade dos microssatélites plastidiais utilizando os seguintes parâmetros: número de haplótipos detectado em cada amostra, diversidade gênica (H_k) e riqueza alélica plastidial (P_b); todos estimados utilizando o programa CONTRIB (Petit et al., 1998).

Tanto para os marcadores nucleares quanto para os marcadores plastidiais foram feitas análises de variância molecular (AMOVA) no programa ARLEQUIN V.3.5.1.2. (Excoffier et al. 2005) para avaliar os padrões de distribuição da variação genética em modelos hierárquicos. A significância de cada modelo foi testada usando 10.000 permutações. Para essas análises, os híbridos foram desconsiderados.

As AMOVAs foram realizadas seguindo os seguintes modelos hierárquicos: (1) todas as espécies e populações, separando as populações de *P. flammea* em um grupo diferente das populações de *P. corcovadensis*, sendo calculada a variação genética: entre espécies (F_{CT}) e entre populações dentro de cada espécie (F_{SC}) e dentro das populações e entre as populações (F_{ST}); (2) apenas indivíduos de *P. flammea* de todas as populações, calculando dentro populações e entreas populações (F_{ST}); e (3) apenas *P. corcovadensis* das populações simpátricas, também calculando dentro populações e entre as populações (F_{ST}).

3. RESULTADOS

Todos os 10 microssatélites nucleares foram polimórficos em todas as populações analisadas e foram encontrados um total de 161 alelos. Na zona híbrida de Teresópolis *P. flammea* apresentou $H_e = 0,641$ e $H_o = 0,469$; *P. corcovadensis* apresentou $H_e = 0,647$ e $H_o = 0,611$; e híbridos apresentaram H_e e H_o de 1,000. Na zona híbrida do Corcovado *P. flammea* apresentou $H_e = 0,592$ e $H_o = 0,399$; *P. corcovadensis* apresentou $H_e = 0,287$ e $H_o = 0,199$; e híbridos apresentaram $H_e = 0,632$ e $H_o = 0,384$. A população de *P. flammea* de Paraty apresentou $H_e = 0,530$ e $H_o = 0,526$; e de Picinguaba apresentou valores de $H_e = 0,465$ e $H_o = 0,425$ (Tabela 4). Em todos os casos a heterozigosidade observada foi menor que a esperada. A zona do Corcovado apresentou índices menores que de Teresópolis, e as populações alopátricas de *P. flammea* apresentaram índices menores ainda do que as *P. flammea* das duas zonas simpátricas.

A A_r média foi de 2,291 em Teresópolis: *P. flammea* apresentou $A_r = 2,480$; *P. corcovadensis* apresentou $A_r = 2,393$; e híbridos apresentara $A_r = 2,000$. Corcovado apresentou A_r médio igual a 1,734. *P. flammea* apresentou $A_r = 2,012$; *P. corcovadensis* apresentou $A_r = 1,360$; e híbridos apresentara $A_r = 1,829$. As populações alopátricas de Paraty e Picinguaba apresentaram A_r de 1,816 e 1,713 respectivamente.

O coeficiente de endocruzamento para as *P. flammea* das zonas simpátricas não variou muito ($F_{IS} = 0,272$ em Teresópolis e $F_{IS} = 0,270$ no Corcovado, tendo como F_{IS} médio = 0,271). Nas populações alopátricas também não houve muita variação, porém os coeficientes de endocruzamento foram bem abaixo das *P. flammea* simpátricas ($F_{IS} = -0,005$ para Paraty e $F_{IS} = 0,066$ em Picinguaba). Para as *P. corcovadensis* a variação do coeficiente de endocruzamento entre as zonas simpátricas foi menor, e abaixo do coeficiente das *P. flammea* ($F_{IS} = 0,050$ em Teresópolis e $F_{IS} = 0,199$ no Corcovado, com F_{IS} médio = 0,125). Híbridos apresentaram o coeficiente de endocruzamento baixo ($F_{IS} = -1,000$ em Teresópolis e $F_{IS} = 0,028$ no Corcovado). O programa GENEPOP revelou que as espécies e os híbridos das zonas híbridas estão fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e que as populações alopátricas de *P. flammea* estão dentro do equilíbrio ($p < 0,05$) - (Tabela 4).

A análise do STRUCTURE gerado apenas com as zonas simpátricas revelou quais indivíduos pertencem a *P. flammea*, *P. corcovadensis* ou híbridos (Figura 1). O programa STRUCTURE-HARVESTER apresentou um agrupamento ótimo de $K = 2$ (Figura 4A) de acordo com o número de espécies analisadas. Na zona de Teresópolis foram identificados 32 indivíduos de *P. flammea*, 11 de *P. corcovadensis* e apenas um híbrido. Na zona do Corcovado foram identificados 21 indivíduos de *P. flammea*, 31 de *P. corcovadensis* e 12 indivíduos híbridos.

A análise do STRUCTURE gerado com as populações simpátricas e alopátricas somente de *P. flammea* apresentou dois grupos genéticos de $K = 2$ (Figura 4B) segundo o STRUCTURE-HARVESTER (Figura 2); mostrando que ocorre uma subestruturação dentro da espécie *P. flammea*.

Os AMOVAS nucleares para todas as espécies e populações apresentou os seguintes resultados: entre espécies $F_{CT} = 0,171$; entre populações dentro das espécies $F_{SC} = 0,336$; e entre as populações das populações $F_{ST} = 0,450$. Para a AMOVA considerando apenas *P. flammea*, foi encontrado $F_{ST} = 0,290$. Para a AMOVA considerando somente *P. corcovadensis*, foi encontrado $F_{ST} = 0,454$.

Seguindo os mesmos parâmetros de agrupamento dos AMOVAs nucleares, as análises plastidiais apresentaram altos e significantes valores de diferenciação genética entre espécies e populações. Todas as espécies e populações apresentaram os seguintes resultados: entre espécies $F_{CT} = 0,338$; entre populações dentro das espécies $F_{SC} = 0,844$; e entre as populações $F_{ST} = 0,791$. Para a AMOVA considerando somente *P. flammea*, foi encontrado $F_{ST} = 0,937$. Para a AMOVA considerando apenas *P. corcovadensis*, foi encontrado $F_{ST} = 0,558$.

Tabela 4 - Caracterização das espécies do gênero *Pitcairnia*, incluindo tamanho da amostra (N), número de alelos por locus (A), riqueza alélica nuclear (Ar), heterozigose observada (Ho), heterozigose esperada (He), coeficiente de endocruzamento (Fis), diversidade gênica (Hk), riqueza alélica plastidial (Pb) e haplótipos.

População/Espécies	Nuclear							Plastidial		
	N	A	Ar	Ae	Ho	He	F _{IS}	Hk	Pb	Haplótipos
Teresópolis - RJ										
<i>Pitcairnia flammea</i> (E1FL)	31	9,3	2,48	22	0,469	0,641	0,272*	0.000	0.000	H9
<i>Pitcairnia corcovadensis</i> (E1CO)	11	6,2	2,393	11	0,611	0,647	0,050*	0.000	0.000	H9
Híbridos (E1HB)	1	2	2,000	0	1,000	1,000	-1,000*	-	-	H9
Média			2,291		0,633	0,762		-	-	
Corcovado - RJ										
<i>Pitcairnia flammea</i> (RJFL)	21	5,7	2,012	8	0,399	0,592	0,270*	0.678	1.499	H1, H2, H3 e H4
<i>Pitcairnia corcovadensis</i> (RJCO)	31	3,5	1,360	1	0,199	0,287	0,199*	0.640	1.329	H1, H2, H6 e H7
Híbridos (RJHB)	12	5,1	1,829	2	0,553	0,632	0,028*	0.722	1.563	H1, H2 e H6
Média			1,734		0,384	0,504				
Paraty - RJ										
<i>Pitcairnia flammea</i> (PAP)	16	3,5	1,816	1	0,526	0,530	-0,005	0.000	0.000	H5
Picinguaba - SP										
<i>Pitcairnia flammea</i> (PI)	22	3,5	1,713	4	0,425	0,465	0,066	0.000	0.000	H9

*- Amostra não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$).

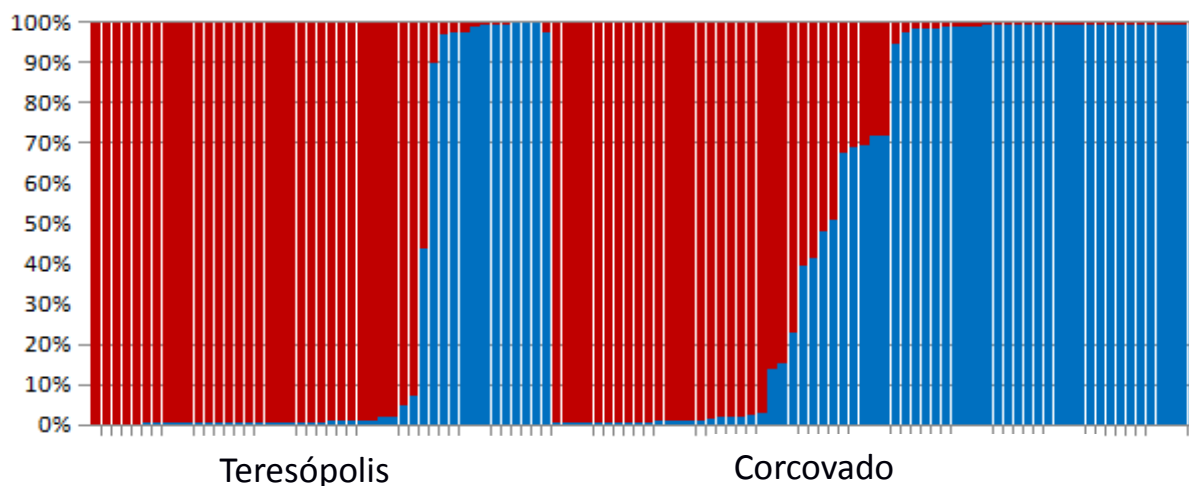


Figura 1 – STRUCTURE das zonas híbridas de Teresópolis (E1FL e E1CO - esquerda) e Corcovado (RJFL e RJCO - direita). Cada barra vertical representa um indivíduo. A proporção de cor em cada barra representa a probabilidade de atribuição da espécie do indivíduo. Vermelho: *Pitcairnia flammea*. Azul: *Pitcairnia corcovadensis*.

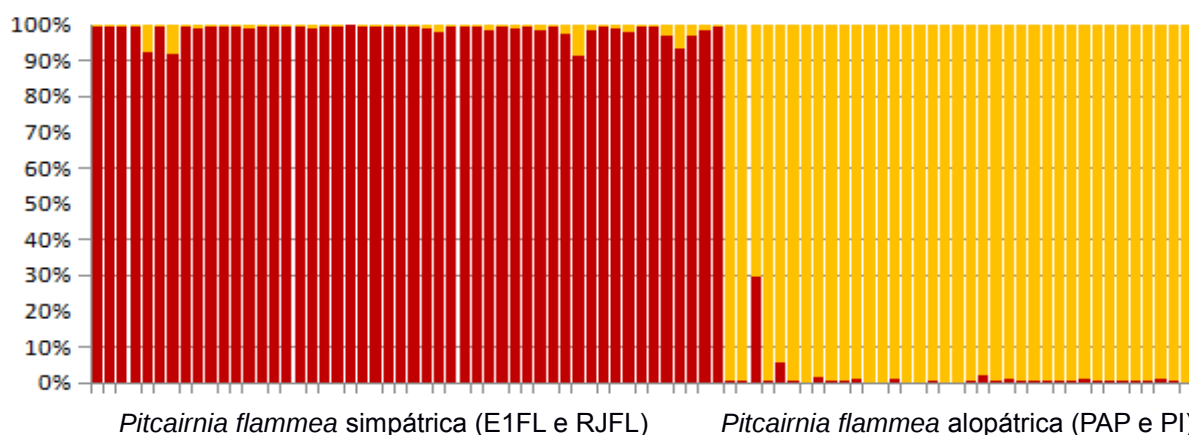


Figura 2 – STRUCTURE contendo apenas indivíduos de *P. flammea*. Cada barra vertical representa um indivíduo. A proporção de cor em cada barra representa a probabilidade de atribuição da espécie do indivíduo. Vermelho: *Pitcairnia flammea* simpátrica (E1FL e RJFL). Amarelo: *Pitcairnia flammea* alopátrica (PAP e PI).

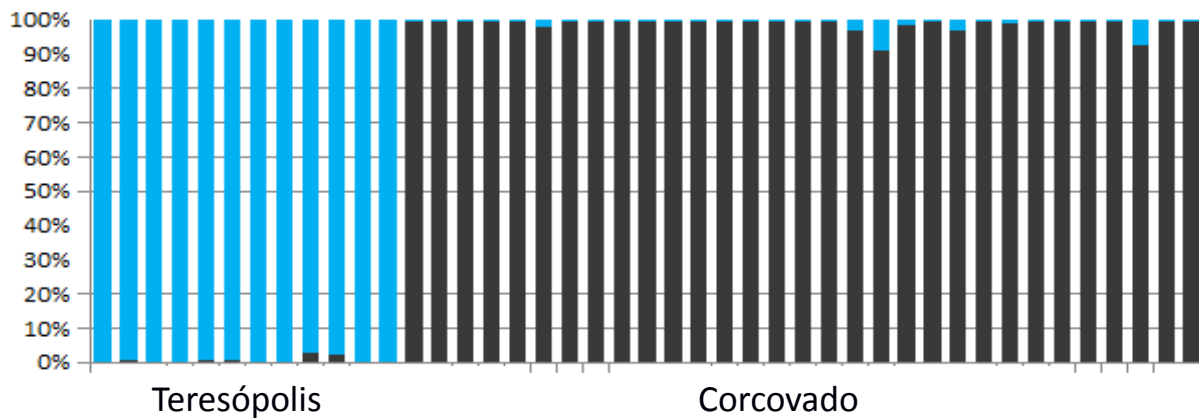


Figura 3 – STRUCTURE contendo apenas indivíduos de *P. corcovadensis*. Cada barra vertical representa um indivíduo. A proporção de cor em cada barra representa a probabilidade de atribuição da espécie do indivíduo. Azul: *P. corcovadensis* Teresópolis (E1CO). Cinza: *P. corcovadensis* Corcovado (RJCO).

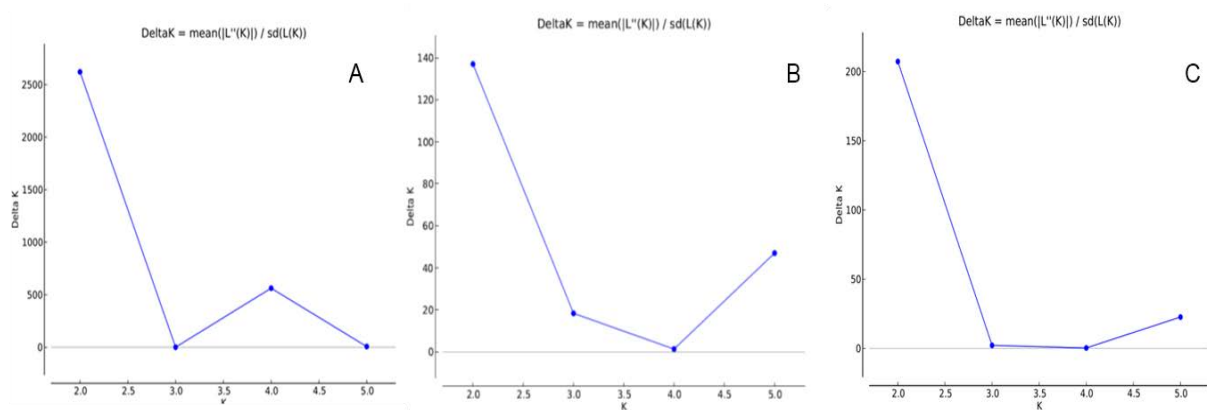


Figura 4 – Delta K (agrupamentos ótimos) apontados pelo programa STRUCTURE-HARVERSTER. A: Structure zonas híbridas. B: Structure *P. flammea*. C: Structure *P. corcovadensis*.

Resultado similar foi encontrado na análise do STRUCTURE gerado apenas com *P. corcovadensis* das populações alopátricas. O programa STRUCTURE-HARVESTER indicou um agrupamento ótimo de $K = 2$ (Figura 4C), separando *P. corcovadensis* de Teresópolis e do Corcovado, também mostrando sub-estuturação dentro da espécie (Figura 3).

O NEWHYBRIDS da zona simpátrica de Teresópolis classificou o mesmo indivíduo híbrido apontado pelo STRUCTURE (Figura 5). No total foram identificados 20 indivíduos de *P. flammea*, 12 de *P. corcovadensis* e 12 indivíduos não classificados. O NEWHYBRIDS da zona do Corcovado (Figura 6) apresentou grande parte dos híbridos identificados no STRUCTURE como geração F2. No total foram identificados 21 indivíduos de *P. flammea*, 30 de *P. corcovadensis*, 10 indivíduos F2 e três não classificados. Sendo assim esses resultados não indicam a ocorrência de introgressão em nenhuma das zonas híbridas.

A combinação das variantes genéticas das regiões de microssatélites plastidiais identificou um total de nove haplótipos. Esses nove haplótipos obtidos foram relacionados filogeneticamente através do programa NETWORK (Figura 7). Tendo como base a classificação dos indivíduos segundo STRUCTURE, seis haplótipos foram característicos da zona híbrida do Corcovado (H1, H2, H3, H4, H6 e H7): sendo dois exclusivos de *P. flammea* (H3 e H4), um exclusivo de *P. corcovadensis* (H7), e os híbridos apresentaram os haplótipos H1, H2, e H6. A zona híbrida de Teresópolis apresentou apenas um haplótipo característico (H9), compartilhado por ambas espécies e o híbrido. As populações alopátricas de *P. flammea* apresentaram haplótipos exclusivos, sendo H5 de Paraty e H8 de Picinguaba. Nenhum haplótipo foi compartilhado entre populações diferentes (Tabela 5).

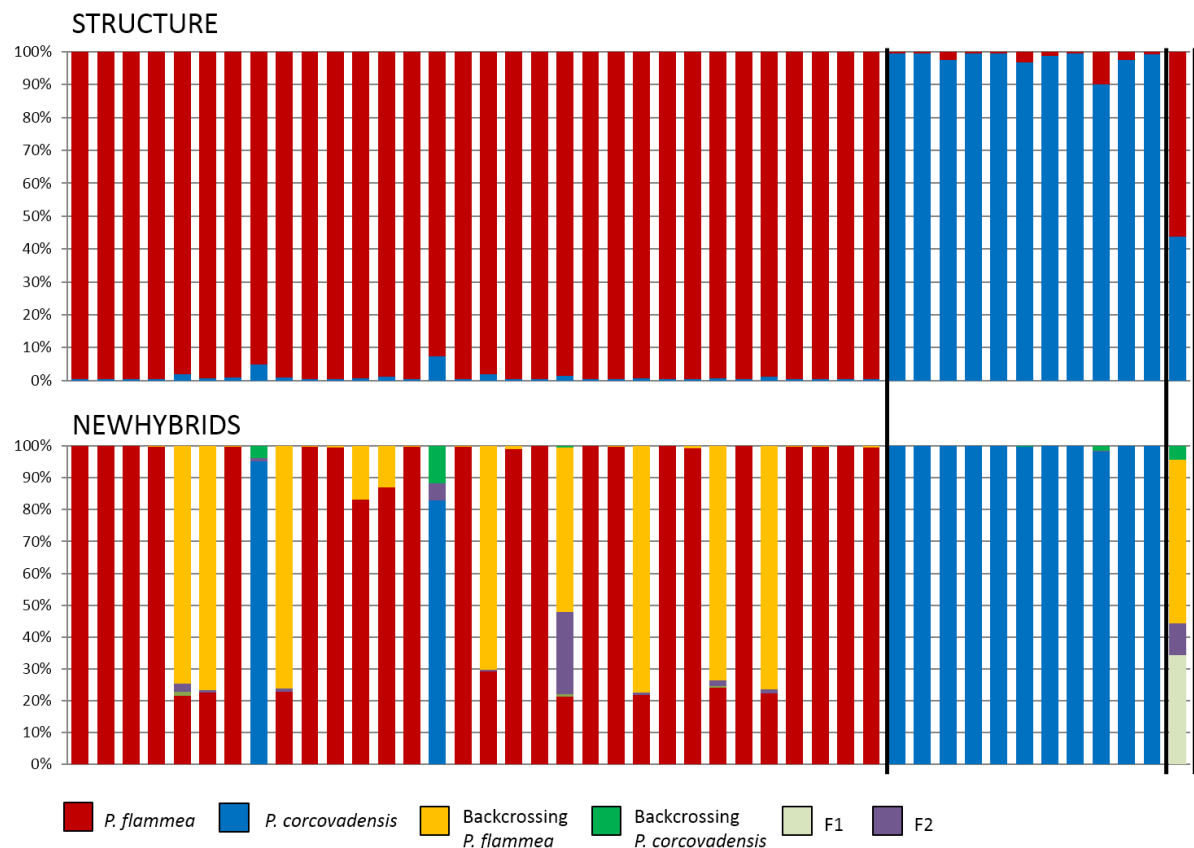


Figura 5 – STUCTURE e NEWHYBRIDS da zona híbrida de Teresópolis. Cada barra vertical representa um indivíduo, A proporção de cor em cada barra representa a probabilidade de atribuição genotípica do indivíduo (parentais puros, F1, F2 e retrocruzamento).

O programa CONTRIB revelou valores de diversidade gênica plastidial semelhantes para ambas as espécies na zona híbrida do Corcovado: $H_k = 0,640$ para *P. corcovadensis* e $0,678$ para *P. flammea*, sendo um pouco mais elevado nos híbridos, com valor de $0,722$. Para Teresópolis os valores de H_k foram de zero para ambas as espécies e como só houve um híbrido, este não apresentou valor de diversidade. Para as populações alopátricas de Paraty e Picinguaba, com haplótipos fixados, os H_k também foram iguais a zero (Tabela 6).

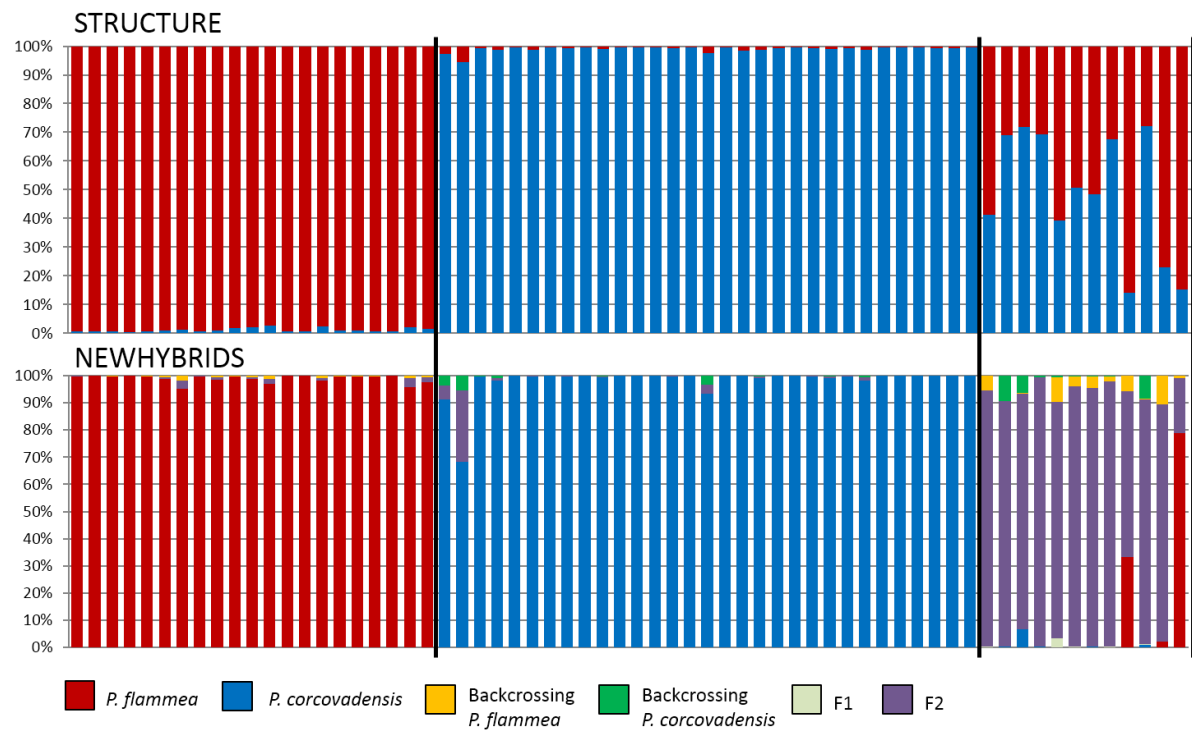


Figura 6 – STUCTURE e NEWHYBRIDS da zona híbrida do Corcovado. Cada barra vertical representa um indivíduo, A proporção de cor em cada barra representa a probabilidade de atribuição genotípica do indivíduo (parentais puros, F1, F2 e retrocruzamento)

Tabela 5 - Distribuição e freqüências dos haplótipos de microsatélites plastidiais nas 8 populações analisadas.

	RJCO	RJFL	RJHB	E1CO	E1RJ	E1HB	PAP	PI
H1	1	5	2					
H2	8	10	4					
H3		1						
H4		4						
H5							16	
H6	7		3					
H7	1							
H8								15
H9				10	29	1		
Total Pop	17	20	9	10	29	1	16	15

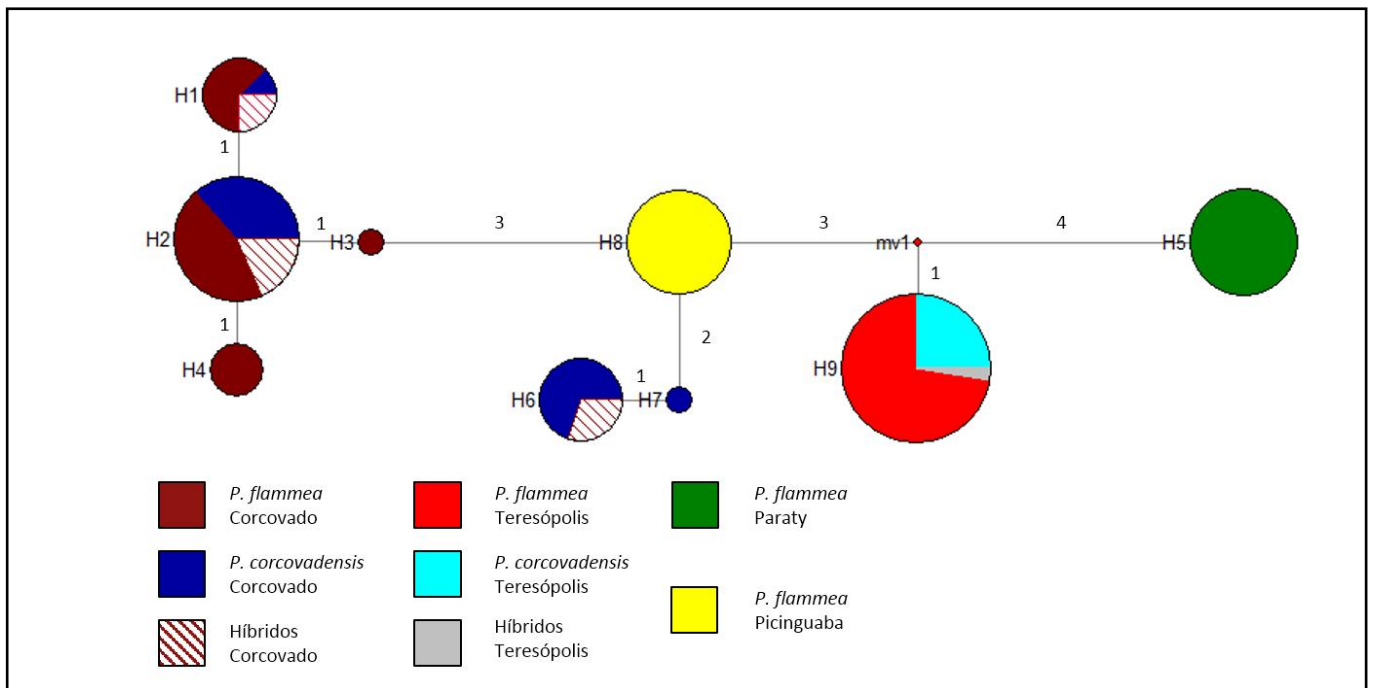


Figura 7 – Rede de haplótipos (NETWORK 4.5.1.6.) contendo as populações de Teresópolis, Corcovado, Paraty e Pinguaba. Seis haplótipos foram característicos da população do Corcovado (H1, H2, H3, H4, H6 e H7), um haplótipo característico de Teresópolis (H9), um de Paraty (H5) e um de Pinguaba (H8).

Tabela 6- Resultados das análises de variância molecular (AMOVA) dos microssatélites nucleares e plastidiais para *Pitcairnia*.

Modelo		Nuclear			Plastidial		
		Variação (%)	Estatística F	Valor de P	Variação (%)	Estatística F	Valor de P
Todas populações por espécie	Entre as espécies	17,126	$F_{CT} = 0.171$		-33,851	$F_{CT} = 0.338$	
	Entre as populações, dentro dos grupos	27,847	$F_{SC} = 0.336$	< 0.001	112,933	$F_{SC} = 0.844$	< 0.001
	Dentro das populações	55,026	$F_{ST} = 0.450$		20,917	$F_{ST} = 0.791$	
<i>Pitcairnia flammea</i>	Entre as populações	29,009	$F_{ST} = 0.290$	< 0.001	93,758	$F_{ST} = 0.937$	< 0.001
	Dentro das populações	70,991			6,242		
<i>Pitcairnia corcovadensis</i>	Entre as populações	45,446	$F_{ST} = 0.454$	< 0.001	55,793	$F_{ST} = 0.558$	< 0.001
	Dentro das populações	54,554			44,207		

4. DISCUSSÃO

Eventos de hibridação foram detectados em ambas as populações simpátricas de *P. flammea* e *P. corcovadensis* analisadas, confirmando as hipóteses anteriores de hibridação entre estas espécies baseadas em observações de campo, existência de morfologia floral intermediária (Wendt et al., 2002), e experimentos de cruzamento interespecíficos manuais (Roças et al. 2004). Os resultados do STRUCTURE e NEWHYBRIDS foram semelhantes em ambas as populações simpátricas, onde houve concordância na classificação dos indivíduos híbridos em cada programa. Entretanto o programa NEWHYBRIDS apresentou baixo poder e acurácia na determinação da classe genotípica de alguns indivíduos, principalmente nos supostos resultantes de retrocruzamento com *P. flammea*. Similar ao encontrado por Burgarella et al. (2009), estes resultados indicam que, embora a identidade correta de indivíduos híbridos não pode ser garantida em todos os casos, é possível obter uma boa estimativa da proporção real de híbridos nas amostras. Apesar de não ficar claro, o indício de retrocruzamento com *P. flammea* sugere a existência de fluxo gênico entre *P. flammea* e *P. corcovadensis*, mais especificamente com alelos de *P. corcovadensis* sendo incorporados em *P. flammea*. Essa introgressão poderia explicar o fato de o programa NEWHYBRIDS classificar dois indivíduos de *P. flammea* como *P. corcovadensis* em Teresópolis. Wendt et al. (2002) e Roças et al. (2004) já haviam sugerido a existência de cruzamento interespecífico entre as espécies aqui estudadas através de estudos de cruzamento artificiais. De forma interessante, o número de híbridos encontrados nesse trabalho foi diferente entre as duas zonas híbridas estudadas: um indivíduo em Teresópolis e 12 indivíduos no Corcovado.

Os resultados dos marcadores nucleares obtidos no STRUCTURE mostraram *P. flammea* e *P. corcovadensis* como linhagens evolutivas distintas, indicado dois agrupamentos com divergência genética alta e significativa ($F_{CT} = 0.171$, Tabela 6). O fato de poucos híbridos terem sido encontrados e da maioria desses indivíduos híbridos serem de geração F2 indica uma eficiência das barreiras reprodutivas entre as espécies, porém sugere que o isolamento não está completo. Os híbridos F2 podem ser tardios, resultados de cruzamentos entre si. Porém com o indício da

formação de híbridos nos cruzamentos manuais (Rôças et al., 2004), é provável que a hibridação ocorra no presente. De forma geral esses resultados mostram que *P. flammea* e *P. corcovadensis* são espécies proximamente relacionadas, como apontado por Wendt et al. (2000) e Saraiva (2013).

Os valores de caracterização genética diferenciaram entre as zonas simpátricas, indicando que a população de Teresópolis é mais diversa que a população de Corcovado. Além disso, em Teresópolis os valores de heterozigosidade e riqueza alélica foram similares entre as espécies; no Corcovado esses mesmos valores foram mais elevados em *P. flammea* do que em *P. corcovadensis*. Ao contrário do observado para o genoma nuclear, a análise dos haplótipos e a diversidade gênica dos marcadores plastidiais: em Teresópolis apenas um haplótipo foi encontrado para ambas as espécies e híbridos; e no Corcovado vários haplótipos foram encontrados, sendo alguns exclusivos e alguns compartilhados entre as espécies.

Os nossos resultados indicam o compartilhamento de haplótipos em ambas as zonas simpátricas, onde inclusive uma das zonas apresentou fixação de um único haplótipo. O compartilhamento de haplótipo pode ser explicado por três eventos distintos, sendo eles hibridação e introgressão; retenção de polimorfismo ancestral, ou ainda homoplasia, além da combinação desses três fatores (Palma-Silva et al., 2011). O compartilhamento de polimorfismo ancestral ocorre em espécies proximamente relacionadas, como *P. flammea* e *P. corcovadensis* (Wendt et al., 2000; Saraiva, 2013). A ocorrência de homoplasia não pode ser descartada. No entanto a evidencia de hibridação entre *P. flammea* e *P. corcovadensis* foi comprovada através das análises do genoma nuclear (Figura 1) e dos cruzamentos artificiais com a produção de prole híbrida viável (Rôças et al., 2004).

Como observado nesse trabalho e anteriormente mostrado por Wendt et al. (2000; 2002), o isolamento reprodutivo geográfico entre *P. flammea* e *P. corcovadensis* é inexistente, já que elas ocorrem simpatricamente em inselbergs no Estado do Rio de Janeiro. No entanto, divergência dos picos dos períodos de floração das espécies (Rocha-Pessôa; Rocha, 2008; Wendt et al., 2002), com apenas uma pequena sobreposição entre elas, pode constituir uma importante barreira de isolamento reprodutivo pré-cruzamento. Levando-se em conta a natureza sequencial

das barreiras de isolamento reprodutivo (Coyne; Orr, 2004) o isolamento fenológico ocorre primeiro, sendo potencialmente a barreira mais importante na prevenção de híbridos. Por exemplo, a fenologia floral divergente resulta em um isolamento reprodutivo substancial entre duas espécies de plantas norte-americanas: *Iris fulva* e *I. brevicaulis* (Martin et al., 2007).

Wendt et al 2002, propôs que o isolamento reprodutivo pré-cruzamento entre *P. flammea* e *P. corcovadensis* poderia também ser influenciado pelas diferenças nos sistemas reprodutivos das espécies. *P. corcovadensis* é a espécie com maiores taxas de autofecundação e *P. flammea* apesar de realizar autofecundação, apresenta características que indicam maior ocorrência de fecundação cruzada. No entanto os resultados genéticos obtidos nesse trabalho indicam que *P. flammea* nas populações simpátricas, ao contrário do esperado para espécies de fecundação cruzada, apresenta uma taxa de endocruzamento ($F_{IS} = 0,271$) mais elevada do que *P. corcovadensis* ($F_{IS} = 0,125$). Já nas populações alopátricas o coeficiente de endocruzamento de *P. flammea* foi baixo ($F_{IS} = 0,031$), indicando altas taxas de fecundação cruzada. Dessa forma a autofecundação parece ser uma barreira reprodutiva pré-cruzamento importante para ambas as espécies, quando em simpátria. Estudos detalhados dos sistemas reprodutivos das espécies baseados em técnicas mais refinadas como a genotipagem de progênies deverão esclarecer a relativa contribuição da autofecundação como barreira de isolamento reprodutivo entre estas espécies.

Contrapondo o indício de ausência de isolamento reprodutivo pós-zigótico, os mesmos estudos de sobrevivência e crescimento realizados por Rôças et al. (2004) com indivíduos provenientes de retrocruzamento apresentaram resultados assimétricos. Primeiramente o número de frutos é maior quando o híbrido é o receptor de pólen do que quando um indivíduo parental é o receptor. Além disso, a taxa de sucesso reprodutivo relativo é menor quando *P. flammea* é o receptor do pólen do que quando *P. corcovadensis* é o receptor. A diferença de aptidão entre os retrocruzamentos sugere a existência de isolamento reprodutivo pós-zigótico, pois a introgressão pode não ocorrer nas duas espécies.

O compartilhamento de haplótipos plastidiais entre os híbridos e ambos os parentais revelam que a hibridação é simétrica, ou seja, ocorrem em ambas as

direções; com híbridos e parentais doando e recebendo pólen. Isso pode ser concluído com base na herança unidirecional do cloroplasto em angiospermas, sendo esse geralmente de herança maternal (Freeland, 2009; Raven, 2007). Da mesma forma os marcadores nucleares também não indicaram a presença introgressão, uma vez que em nenhuma das duas zonas híbridas foram observados indivíduos classificados pelo NEWHYBRIDS (Figuras 5 e 6) como retrocruzamento com as espécies parentais, corroborando a eficiência das barreiras de isolamento reprodutivo. Rôças et al. (2004) encontrou baixas taxas de sobrevivências das plântulas provenientes de experimentos de retrocruzamentos manuais. O fato de não termos encontrado nenhum indivíduo de retrocruzamento nas populações naturais, pode significar que nossa amostragem não foi completa e/ou também que a taxa de sobrevivência das progênes de retrocruzamento ainda é menor em condições naturais; corroborando assim a eficiência das barreiras pós-zigóticas na manutenção da integridade das espécies.

Todos os resultados de caracterização e estruturação genética apontaram para uma alta estruturação entre as espécies e as populações que as compõe. A estruturação genética foi maior entre as populações simpátricas e alopátricas de *P. flammea*, do que entre *P. flammea* e *P. corcovadensis* das regiões simpátricas, similarmente ao encontrado por Palma-Silva et al. (2011) em estudos com espécies de *Pitcairnia*. Isso indica um baixo fluxo gênico intraespecífico de *P. flammea* de populações de diferentes afloramentos rochosos, uma vez que nenhum haplótipo foi compartilhado entre as populações. Adicionalmente, a estruturação encontrada nos haplótipos de genoma plastidial foi bem elevada, com forte diferenciação entre as populações, mas com diferenciação mais baixa entre as espécies; como já havia sido observado por Palma-Silva et al. (2011). Levando-se em conta que a dispersão do pólen é realizada por beija-flores e abelhas e que as sementes não possuem mecanismo de dispersão eficiente (Benzing, 2000; Saraiva, 2013) é de se esperar um baixo raio de dispersão do pólen e das sementes e consequentemente baixo fluxo gênico entre as populações. Além disso, os altos índices dos coeficientes de endogamia observado nas duas espécies também promovem uma maior estruturação genética das populações. Palma-Silva et al. (2011) já havia demonstrado o baixo fluxo gênico intraespecífico em *Pitcairnia* habitantes de inselbergs, onde os padrões de diversificação são semelhantes aos encontrados em

ilhas; pois o isolamento espacial e ecológico fornece uma barreira contra a dispersão (Porembski, 2007).

Um resultado aparentemente inesperado foi o aparecimento de dois alelos exclusivos dos híbridos do Corcovado, pois não se espera que híbridos tenham alelos não pertencentes a uma das espécies parentais. Porém é sabido que *P. flammea* e *P. corcovadensis* podem ocorrer em simpatria com *P. albiflos*, espécie endêmica de afloramentos rochosos das cidades de Rio de Janeiro e Niterói (Palma-Silva et al., 2011). Wendt et al. (2002) e Palma-Silva et al. (2011) demonstraram que todas as três espécies são autocompatíveis e apontaram suspeitas de hibridação entre elas. Dessa forma, os dois alelos exclusivos encontrados nos híbridos do Corcovado podem ser provenientes de uma hibridação com *P. albiflos*; indicando que os padrões e processos de especiação deste grupo de espécies podem ser ainda mais complicados do que aparentam.

Os resultados indicaram também a necessidade do levantamento e utilização de um maior número de loci tanto do genoma nuclear quanto de regiões do genoma plastidial, de forma que as caracterizações das espécies e a classificação dos indivíduos sejam feitos com maior precisão.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho somados aos resultados provenientes do levantamento bibliográfico sugerem que uma série de barreiras podem contribuir para o isolamento reprodutivo entre *Pitcairnia flammea* e *P. corcovadensis*.

A alta estruturação genética e a integridade genômica encontrada entre as espécies são mantidas por barreiras de isolamento reprodutivo pré e pós-zigóticas, tais como fenologia floral divergente, altos níveis de autofecundação e inviabilidade dos híbridos. O fato de híbridos terem encontrados não indica necessariamente que ocorre fluxo gênico entre as espécies, uma vez que a introgressão não foi observada.

A alta estruturação e diferenciação encontrada entre as populações simpátricas e alopátricas de *P. flammea* indicam pouco fluxo gênico e isolamento geográfico entre diferentes afloramentos rochosos, com grande efeito de deriva genética nos processos evolutivos deste grupo de plantas.

6.REFERÊNCIAS

- ANDERSON, E.C.; THOMPSON, E.A. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data, **Genetics**, v. 160, p. 1217–1229, 2002.
- ARAÚJO, A.C.; FISCHER, E.A.; SAZIMA, M. Floração sequencial e polinização de três espécies de *Vriesea* (Bromeliaceae) na região de Juréia, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 17, p. 113-118, 1994.
- AVISE, J.C. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall, 1994.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37–48, 1999.
- BARBARÁ, T. et al. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Mol Ecol.**, v. 16, n. 10, 1981-92, May.2007.
- BARTON, N.H.; HEWITT, G.M. Analysis of hybrid zones. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 113–148, 1985.
- BASTEN, C.J.; ASMUSSEN, M.A. The exact test for cytonuclear disequilibria. **Genetics**, v. 146, p. 1165-1171, 1997.
- BENCKE, C.S.C.; MORELLATO, L.P.C. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. **Rev. bras. Bot.**, São Paulo , v. 25, n. 3, Sept. 2002.
- BENZING, D.H. **Bromeliaceae**: profile of an adaptive radiation. Cambridge. University Press, 2000.
- BOISSELIER-DUBAYLE, M.C. et al. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana – a test of the forest refuge hypothesis. **Ecography**, v. 33, p. 175–184, 2010.
- BONEH, L.; KUPERUS, P.; VAN TIENDEREN, P.H. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 302–303, 2003.

- BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 4, p. 960-973, Nov. 2001.
- BRITO, M.C.W. et al. Parque Estadual da Serra do Mar: Plano de Manejo. Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 2006.
- BURGARELLA, C. et al. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). **Heredity**, v. 102, p. 442–452, 2009.
- CESAR, O.; MONTEIRO, R. Florística e fitossociologia de uma floresta sobre a restinga em Picinguaba (Parque Estadual da Serra do Mar) município de Ubatuba, SP. **Naturalia**, v. 20, p. 21-35, 1995.
- CHARI, J.; WILSON, P. Factors limiting hybridization between *Penstemon spectabilis* and *Penstemon centranthifolius*. **Can. J. Bot.**, v. 79, p. 1439–1448, 2001.
- COSTA, D.P.; YANO, O. Hepáticas talosas do Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. bras.** São Paulo, Brasil., v. 1, n. 2, p. 73-82, 1988.
- COYNE, J.A.; ORR, H.A. 2004. **Speciation**. Sinauer Associates, Inc. 554 páginas.
- DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 84, p. 1658-1663, 1997.
- DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Mol. Ecol. Notes**, v. 3, p. 167–169, 2003.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.A. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13–15, 1990.
- EARL, D.A.; VON HOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conserv. Gen. Resour**, v. 4, p. 359–361, 2011.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética de conservação e o conceito das unidades evolutivamente significativas. **Braz J Genet**, v. 19(Suppl), p. 23-29, 1996.

- ELLSTRAND, N.C.; WHITKUS, R.; RIESEBERG, L.H. Distribution of spontaneous plant hybrids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5090-5093. 1996.
- ERLICH, H. A. Polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Immunology**, v. 9, n. 6, p. 437-447, Set., 1989.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47–50, 2005.
- FORZZA, R.C. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 14 Jan. 2015
- FREELAND, J.R. 2009. **Molecular Ecology**. England: John Wiley & Sons, Ltd. 388 páginas.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA/INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995-2000**. Relatório Final. São Paulo, 2002.
- GIVINISH, T.J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 872–895, 2011.
- GIVNISH, T.J. et al. Phylogeny, adaptive radiations, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso**, v. 23, p. 3-26, 2007.
- GUIMARÃES, A.E.: ARLÉ, M. Mosquitos dos Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Brasil: I- distribuição estacional. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 3, Set., 1984.
- HUBISZ, M.J. et al. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Mol. Ecol. Res.**, v. 9, p. 1322–1332, 2009.

ICMBio (2008). **Plano de manejo do Parque Nacional da Serra dos Órgãos**.

Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/unidades-de-conservacao/biomas-brasileiros/mata-atlantica/unidades-de-conservacao-mata-atlantica/2196-parna-da-serra-dos-orgaos.html>>. Acesso em: 20 Dez. 2014

KALINOWSKI, S.T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conserv. Genetics**, v. 5, p. 539-543, 2004.

LEME, E.M.C.; MARIGO, L.C. **Bromeliads in the Brazilian wilderness**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual Ltda, 183 p., 1993.

LEXER, C. et al. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1045–1057, 2005.

LOUZADA, R.F. **Revisão taxonômica e filogenia de *Orthophytum* Beer (Bromeliaceae, Bromelioideae)**. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012

LOWRY, D.B. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. **Philos. T. Roy. Soc. London**, 2008.

MARTIN, N.H.; BOUCK, A.C.; ARNOLD, M.L. The genetic architecture of reproductive isolation in Louisiana Irises: flowering phenology. **Genetics Society of America**, v. 175, p. 1803-1812, Abr., 2007.

McDONALD, D.B.; POTTS, W.K. Microsatellite DNA as a genetic marker at several scales. **Avian Molecular Evolution and Systematics** (D. Mindell, ed.). p. 29-49 Academic Press, New York. 1997.

McMANUS et al. **Estatísticas para descrever Genética de Populações**. Disponível em: <www.animal.unb.br>. Acesso: 26 de Dezembro de 2014.

MITTERMEIER, R.A. et al. **Hotspots Revisited**: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Washington, p. 390, 2004.

MOCCIA, M.D.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. The strength of reproductive isolation in two hybridizing food-deceptive orchid species. **Molecular Ecology**, 2007.

MONTEIRO, R.F.; FORZZA, R.C. A família Bromeliaceae no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 26, p. 7-33, 2008.

MORELLATO, L.P.C. et al. Phenology of Atlantic rain forest trees: a comparative study. **Biotropica**, v. 32, p. 811-823, 2000.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo v. 29, n.2,p. 294-307, 2006.

PAGGI, G.M.; PALMA-SILVA, C.; BERED, F. 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**, v. 8, p. 980–982, 2008.

PALMA-SILVA, C. et al. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 654–657, 2007.

PALMA-SILVA, C. et al. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. **Heredity**, v. 103, p. 503–512, 2009.

PALMA-SILVA, C. et al. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Mol. Ecol.**, v. 20, p. 3185–320, 2011.

PALMA-SILVA, C. **Genética, Filogeografia e Fertilidade de populações de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae)**. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

PETIT, R.J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, v. 12, p. 844–855, 1998.

PINHEIRO, F. et al. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, v. 19, p. 3981–3994, 2010.

- POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 579-586, 2007.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. **Intraspecific gene genealogies**: trees grafting into networks, 2001.
- QIAGEN. DNeasy® 96 Plant Kit Handbook - For high-throughput DNA isolation from plant tissue. **QIAGEN Inc.**, 2002.
- RAMSEY, J.; BRADSHAW, H.D.; SCHEMSKE, D.W. Components of reproductive isolation between the monkey flowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). **Evolution**, v. 57, p. 1520–1534, 2003.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2007. **Biologia Vegetal**, 7a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **J Hered**, v. 86, n.3, p. 248-249, 1995.
- RIDLEY, M. 2003. **Evolution**, 3a. ed. Blackwell Publishing. 751 páginas.
- RIESEBERG, L.H.; CARNEY, S.E. Plant hybridization. **New Phytologist**, v. 140, p. 599-624. 1998.
- RIESEBERG, L.H.; WHITTON, J.; GARDNER, K. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. **Genetics**, v. 152, p. 713–727, 1999.
- RÔÇAS, G.; KLEIN, D.E.; DE MATTOS, E.A. Artificial hybridization between *Pitcairnia flammea* and *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae): analysis of the performance of parents and hybrids. **Plant Species Biology**, v. 19, p. 47–53, 2004.
- ROCHA-PESSÔA, T. C.; ROCHA, C. F. Reproductive cycle of *Pitcairnia flammea* Lindl. (Bromeliaceae/Pitcairnioideae) in an insular Atlantic rainforest area in southeastern Brazil. **Flora**, v. 203, p. 229–233, 2008.
- RODRIGUES, T.M. et al. Desenvolvimento de mudas de Bormélia-Imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 757-763, jul./ago., 2004.

RUNQUIST, R.D.B. et al. Rapid evolution of reproductive isolation between incipient outcrossing and selfing *Clarkia* species. **Evolution**, v. 68, n. 10, p. 2885–2900, 2014.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Third Edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Parque Estadual da Serra do Mar – Plano de Manejo

SARAIVA, D.P. **Filogenia morfológica de *Pitcairnia* L'Hér. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)**. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical, 2013.

SARTHOU, C.; SAMADI, S.; BOISSELIER-DUBAYLE, M.C. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 861–868, 2001.

SAZIMA, I.; VOGEL, S.; SAZIMA, M. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. **Plant Systematics and Evolution**, v. 168, p. 167–179, 1989.

SCHLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v. 354, p. 63–65, 1991.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nat Biotechnol**, v. 18; p. 233–234, 2000.

SCOPECE, G. et al. Components of reproductive isolation between *Orchis mascula* and *Orchis pauciflora*. **Evolution**, v. 67, n. 7, p. 2083–2093, 2013.

SEEHAUSEN, O. Hybridization and adaptive radiation. **Trends Ecol. Evol.** v. 19, p. 198–207, 2004.

SEGATTO, A.L.A. et al. Nuclear and plastidial markers reveal the persistence of genetic identity a new perspective on the evolutionary history of *Petunia exerta*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 70, p. 504–512, 2013.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Flora neotropica**: monography 14, part 1 – Pitcairnioideae. The New York Botanical Garden Hafner Press, New York, 1974.

STEBBINS, G.L. The role of hybridization in evolution. **Proceeding of the American Philosophical Society**, v. 103, p. 231-251. 1959.

THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Published on the Internet;
<<http://www.theplantlist.org/>> Acesso em: 26Dez. 2014.

TURELLI, M.; BARTON, N.H.; COYNE, J.A. Theory and speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 7, p. 330–343, July, 2001.

WALLACE, B. Hard and soft selection revisited. **Evolution**, v. 29, p. 465-473, 1975.

WENDT, T. et al. Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. **Syst. Bot.**, v. 25, p. 389–398, 2000.

WENDT, T. et al. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **Amer. J. Bot.**, v. 88, p. 1760–1767, 2001.

WENDT, T. et al. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **Plant Syst. Evol.** v. 232, p. 201–212, 2002.

WENDT, T.; CHAMAS, C. C. Pitcairnia do leste do Brasil - suas verdadeiras identidades. **Bromélia**, v. 4, p. 12–18, 1997.

WÖHRMANN, T. et al. Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. **Amer. J. Bot.**, v. 99, n. 4, e160–e163, Mar., 2012.

WÖHRMANN, T.; WEISING, K. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 4, p. 635-647, Maio 2011.

WÖHRMANN, T.; WEISING, K. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. **TheorAppl Genet**, v. 123, n. 4, p. 635-647, May., 2011.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**. v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**, v. 15, p. 223-354, 1951.

ZANELLA, C.M. **Padrões históricos e processo de hibridação entre duas espécies simpátricas de bromélias da Mata Atlântica: implicações evolutivas e conservacionistas**. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.