

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 07/12/2019.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE

FILOGEOGRAFIA E GENÔMICA DE POPULAÇÕES DE
Pitcairnia lanuginosa (BROMELIACEAE)

BÁRBARA SIMÕES SANTOS LEAL

Dezembro - 2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE

FILOGEOGRAFIA E GENÔMICA DE POPULAÇÕES DE
Pitcairnia lanuginosa (BROMELIACEAE)

BÁRBARA SIMÕES SANTOS LEAL

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ecologia e Biodiversidade.

Orientadora: Clarisse Palma da Silva

Dezembro - 2018

L435f Leal, Bárbara Simões Santos
Filogeografia e genômica de populações de *Pitcairnia lanuginosa* (Bromeliaceae) / Bárbara Simões Santos Leal.
-- Rio Claro, 2018
155 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Clarisse Palma da Silva

1. Bromeliaceae. 2. Evolução de plantas. 3. Filogeografia. 4. Genética/Genômica de populações. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Filogeografia e genômica de populações de *Pitcairnia lanuginosa* (Bromeliaceae)

AUTORA: BÁRBARA SIMÕES SANTOS LEAL

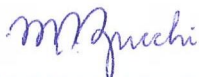
ORIENTADORA: CLARISSE PALMA DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. CLARISSE PALMA DA SILVA

Departamento de Ecologia / UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas / SP



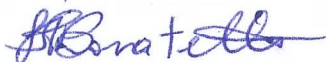
Prof. Dr. MARIA IMACULADA ZUCCHI

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Centro Sul / IAC - Instituto Agronômico de Campinas - Piracicaba / SP



Prof. Dr. FERNANDO DE FARIA FRANCO

Departamento de Botânica / Universidade Federal de São Carlos - Campus Sorocaba / SP



Profa. Dra. ISABEL APARECIDA DA SILVA BONATELLI

Laboratório de Diversidade Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - Campus Sorocaba / SP



Profa. Dra. MARINA CORREA CORTES

Departamento de Ecologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 07 de dezembro de 2018

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todas as agências que financiaram a pesquisa apresentada nesta tese. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (processos 2014/08087-0 e 2016/20273-0). O apoio concedido na forma de bolsas de doutorado e doutorado sanduíche por essas agências foi fundamental para o desenvolvimento desta tese. Além disso, agradeço também a FAPESP pelo financiamento do projeto regular (processo 2014/15588-6), que financiou a obtenção de todos os dados aqui apresentados, e ao LabEx COTE (Université de Bordeaux) pelo auxílio de mobilidade.

Agradeço à UNESP, em especial ao departamento de Ecologia, por ter sido meu segundo lar durante os últimos anos, e ao INRA Pierroton que me recebeu durante o período de sanduíche. Sou grata a todos funcionários da UNESP e do INRA que são responsáveis pela manutenção das atividades de pesquisa e pelo funcionamento geral destas instituições.

A minha orientadora, Clarisse Palma da Silva, agradeço pela excelente orientação, participação ativa e cuidadosa revisão dos manuscritos. Agradeço muito pela confiança e apoio, inclusive nos momentos críticos, e por ter me dado inúmeras oportunidades que me ajudaram a perseverar na ciência. Seu entusiasmo com a pesquisa, bom humor, e positivismo com certeza são uma inspiração para quem a cerca! Deixo registrada aqui minha admiração pela pesquisadora que é, e pela forma como foi conduzida a orientação desta tese, que tornaram minha experiência acadêmica na UNESP muito construtiva. Que a nossa parceria ainda renda muitos bons frutos!

A minha supervisora da BEPE, Myriam Heuertz, agradeço pelas diversas contribuições durante o período de doutorado sanduíche no INRA e na finalização dos manuscritos. Agradeço também pela atenção e pela prontidão em me auxiliar na implementação das análises de dados genômicos, e também pela alegre companhia durante os meses em que vivi na França. Certamente, outra fonte de inspiração no mundo da pesquisa!

Ao Cleber, agradeço pela contribuição em todas etapas da execução desse trabalho, desde a coleta das plantas à análise dos dados e revisão dos manuscritos. Você sabe o quanto a sua criatividade e facilidade em lidar com as análises dos dados ajudaram a moldar esta tese. Mas, claro, devo agradecer por ser muito mais que meu colaborador, mas também meu parceiro e amigo. Durante esse período do doutorado estivemos mais unidos do que nunca, compartilhando um lar, muitos amigos, muitas ideias e cuidado e respeito recíprocos. Foram muitos, muitos momentos felizes em Rio Claro, e alguns momentos críticos, que soubemos atravessar com perseverança. Sua presença fez desses anos os melhores da minha vida e, sem dúvidas, tornou a caminhada do doutorado mais leve e especial. Te admiro e te amo muito! Obrigada por tudo!

À coordenação da Pós-Graduação, e ao conselho do Programa de Pós-graduação, agradeço pelos inúmeros aprendizados durante o ano em que fui representante discente. Além disso, agradeço a todos os professores da UNESP ou de outras universidades e instituições do país que, formal ou informalmente, contribuíram para minha formação, e a banca convidada pela avaliação cuidadosa e inúmeras sugestões de melhoria.

Aos funcionários de unidades de conservação, agradeço pelo suporte e infraestrutura disponibilizada para realizar as coletas de material vegetal. Ao Sérgio Nazareth, parceiro de praticamente todas coletas no Cerrado, meu muito obrigada! Seu bom humor fizeram nossas aventuras (e até as desventuras) muito mais interessantes. Agradeço também a Mônica Arakaki e Pilar Herrera pela ajuda com a solicitação de autorização para coleta de plantas no Peru, e ao Luis Pillaca pela alegre companhia durante a viagem a Oxapampa e La Merced.

Agradeço aos colegas e amigos com quem convivi durante os anos de doutorado no Laboratório de Ecologia Molecular: Bruno Leles, Carla Sardelli, Carolina Carvalho, Cleber Chaves, Débora Cavalcanti, Felipe Aoki, Fernanda Hurbath, Jordana Neri, Juliana Santin, Luiza Fonseca, Mateus Mota, Marcos Queiroz, Marília Souza e Vanessa Graciano. A companhia de vocês tornou a rotina do laboratório consideravelmente mais amena e interessante. Agradeço em especial a Vanessa, que me acompanhou em boa parte do trabalho de bancada, e a minha amiga Fernanda Hurbath pela energia incrível e pela parceria para todas horas. Fê, sua presença no laboratório fez toda diferença e preencheu minhas horas de trabalho de alegria e afeto. Muito obrigada!

Agradeço ao Sérgio Kakazu pela genotipagem dos marcadores microssatélites realizada no CEIS (UNESP), e ao Erwan Guichoux e Chritòphe Boury pelo auxílio no preparo e pelo sequenciamento das bibliotecas de ddRAD na Plateforme Génome Transcriptome (INRA).

A todos os demais colegas e amigos do Departamento de Ecologia, Zoologia e Botânica da UNESP, pela alegria, amizade e agradável convivência. Vocês fizeram deste um dos melhores lugares em que estive. Que ambiente de trabalho sensacional! E que boa vida social levamos juntos! Seria complicado citar o nome de todos amigos aqui sem esquecer de ninguém, mas vocês sabem quem são e como foram importantes durante todos esses anos. Guardo todos os momentos compartilhados com vocês com carinho, e espero reencontrá-los nas estradas da vida.

Agradeço também a minha mãe, pai e irmão, pelo amor incondicional e por serem a base sólida de toda a minha trajetória como pessoa e profissional. Mesmo fisicamente distantes, a nossa conexão e carinho mútuo me fazem seguir em frente. Não tenho palavras para agradecê-los por tudo o que representam! Amo vocês! Por fim, agradeço a todos amigos e parentes de Belo Horizonte, Rio Claro, Bordeaux, e mundo, pelos inúmeros momentos de alegria compartilhados.

DECLARAÇÃO

Declaro que as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da CAPES e FAPESP.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO GERAL	9
CAPÍTULO 1	23
Phylogeographic studies depict the role of space and time scales of plant speciation in a highly diverse Neotropical region	
CAPÍTULO 2	60
Dispersal and local persistence shape the genetic structure of a wide-spread, patchy distributed Neotropical plant species	
CAPÍTULO 3	113
Drift-selection interactions drive the diversification of <i>Pitcairnia</i> <i>lanuginosa</i> (Bromeliaceae) across its broad but patchy Neotropical distribution	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	155

RESUMO GERAL

Os Neotrópicos possuem níveis de diversidade taxonômica, filogenética e funcional extremamente altos, mesmo quando comparados aos de outras regiões tropicais do mundo. O estudo dos processos envolvidos na diversificação de linhagens intra-específicas e no surgimento de novas espécies é essencial para a interpretação dos padrões de alta biodiversidade observados nessa região. Nesta tese, buscamos descrever os padrões de diversificação intra-específica e inferir os processos e mecanismos que governam a diversidade nos Neotrópicos, primeiramente, por meio de uma revisão de estudos filogeográficos de plantas no Brasil (CAPÍTULO 1), e, em seguida, por meio de estudos empíricos utilizando como modelo uma espécie de ampla porém fragmentada distribuição nos Neotrópicos, *Pitcairnia lanuginosa* (Bromeliaceae) (CAPÍTULOS 2 e 3). No CAPÍTULO 1, revisamos os resultados e sintetizamos o conhecimento proveniente de 41 estudos de filogeografia de plantas já publicados. Em suma, nossa revisão mostra que as oscilações climáticas do Pleistoceno afetaram diferentemente plantas associadas a tipos de vegetações contrastantes dentro de cada bioma. Além do clima, os estudos reunidos apontam que variação das condições de solos e o surgimento de barreiras geográficas (como montanhas e rios) também estão envolvidos na evolução da biota vegetal desta região. No CAPÍTULO 2, empregamos marcadores moleculares tradicionais (sequenciamento de sanger e microssatélites) e modelos de distribuição de espécies (SDMs) para verificar o papel dos processos demográficos históricos sobre a variação genética neutra e para verificar a existência de linhagens em *P. lanuginosa*, utilizando uma abordagem filogeográfica. Nossos dados apontam uma baixa diversidade dentro das populações e elevada estrutura genética entre populações da espécie, o que implica num papel determinante da deriva genética para a sua evolução. Além disso, os resultados indicam a existência de duas linhagens em *P. lanuginosa*, ocupando o Cerrado brasileiro e a porção Central dos Yungas andinos, respectivamente, que é potencialmente explicada pela colonização dos Yungas a partir da dispersão do Cerrado. Apesar dos SDMs mostrarem uma pequena expansão geográfica da espécie no último máximo glacial, as oscilações climáticas do Pleistoceno parecem ter tido apenas um papel pequeno da divergência de linhagens, uma vez os dados moleculares mostram uma divergência antiga seguido por persistência sem mudança de tamanho populacional das linhagens. Finalmente, no CAPÍTULO 3, integramos dados provenientes de centenas de marcadores SNPs isolados por ddRAD, e dados fenotípicos fisiológicos a nível populacional, para verificar o papel relativo de deriva genética e seleção natural na alta estruturação genética de *P. lanuginosa*. Os resultados confirmam o papel relevante da deriva apontada no capítulo anterior, mas sugerem que a seleção também pode ter contribuído para a diferenciação genética entre as populações apesar do forte efeito da deriva. Dentre os caracteres fenotípicos testados, apenas dois caracteres associados à tolerância à seca estão potencialmente sob seleção. Padrões de diversificação de espécies herbáceas associadas a ambientes méxicos fragmentados, como *P. lanuginosa*, agregam informações importantes sobre conexões entre biomas e podem ajudar a traçar um panorama geral da história da biogeografia do continente sul-americano. Embora o estudo de evolução da biodiversidade nos Neotrópicos seja desafiador e o nosso conhecimento limitado por alguns obstáculos a pesquisa sobre biodiversidade, o incremento de informações independentes coletadas em uma ampla variedade de organismos tem o potencial de esclarecer os processos complexos que afetaram a biota neotropical.

Palavras-chave: adaptação local; Bromeliaceae; diversificação e especiação; filogeografia; Neotrópicos; sequenciamento RAD.

GENERAL ABSTRACT

The Neotropics harbors high levels of taxonomic, phylogenetic and functional diversity, even comparing to other tropical regions. The studies on processes driving diversification of intra-specific lineages and the origin of new species are essential to interpret the high levels of biodiversity found in this region. Here, we aimed to describe patterns of intra-specific diversification, and infer processes and mechanisms driving the Neotropical diversification by reviewing plant phylogeographic studies in Brazil (CHAPTER 1), and by performing empirical studies using a wide-spread, patchy distributed species, *Pitcairnia lanuginosa*, as a study model (CHAPTERS 2 and 3). In the first chapter, we reviewed and synthesized the knowledge from 41 previously published studies. In summary, we showed that Pleistocene climatic oscillations distinctly affected plants living in contrasting vegetation types within each biome. Despite past climate, these studies pointed that edaphic conditions and geographical barriers (such as mountains and rivers) have also influenced plant evolution patterns in this region. In the second chapter, we employed traditional molecular markers (sanger sequencing and microsatellites genotyping) and species distribution models (SDMs) to test the role of historical demographic processes on neutral genetic variation and verify the existence of lineages within *P. lanuginosa*, using a phylogeographic approach. Our data pointed to low genetic diversity within populations, and high genetic structure among populations within the species, which implies drift as a major force shaping the species evolution. Moreover, results evidenced two distinct *P. lanuginosa* lineages occupying the Brazilian Cerrado and the Central Andean Yungas that have likely diverged through dispersal from the Cerrado to the Central Andean Yungas. Although our SDMs showed a slight expansion of suitable range for *P. lanuginosa* during the Last Maximum Glacial, Pleistocene climatic oscillations seem to have played only a minor role on the diversification of the species, as molecular data show a signature of older divergence, followed by persistence in riparian forests. Finally, at the third chapter, we integrated hundreds of SNP markers defined through double-digest restriction-site associated DNA sequencing (ddRAD-Seq) and population-level phenotypic data, to infer the relative role of natural selection and genetic drift on the high genetic structure of *P. lanuginosa*. Results confirmed the relevant role of drift and suggested that selection plays an additional role on genetic differentiation despite strong drift effect. Among the tested phenotypic traits, only two traits associated to drought tolerance are potentially under selection. Diversification patterns of forbs associated to patchy mesic habitats, such as *P. lanuginosa*, add important information on past connections between biomes and may help to outline the biogeographic history of South America. Although studying biodiversity in the Neotropics remains challenging, and our knowledge is still limited by some obstacle to biodiversity research, increasing independent information from a wide variety of organisms have the potential to elucidate the complex processes driving the Neotropical biota.

Keywords: local adaptation; Bromeliaceae; diversification and speciation; phylogeography; Neotropics; RAD sequencing.

INTRODUÇÃO GERAL

Diversificação e especiação nos Neotrópicos

A região Neotropical é definida como a área que se estende entre o México Central e a Argentina, apresentando diversos biomas com histórias evolutivas distintas e conexões complexas (Morrone, 2013; Hughes et al., 2013). Essa região abriga uma biodiversidade extraordinária, tanto em termos taxonômicos, como em termos filogenéticos e funcionais. (Antonelli et al. 2018), que tem há muito tempo atraído a atenção de pesquisadores (e.g., Humboldt 1820; Gentry 1982). Para alguns grupos, como peixes e plantas, a diversidade de espécies na região é excepcionalmente alta mesmo quando comparada a outras regiões tropicais (Lundberg et al., 2000; Antonelli & Sanmartín, 2011). Dentre as angiospermas, por exemplo, 90-100 mil espécies ocorrem nessa região, o que representa cerca de um terço de toda biodiversidade terrestre, e mais do que o número de espécies somados das demais regiões tropicais (Antonelli & Sanmartín, 2011). Apesar da alta biodiversidade e das inúmeras regiões relevantes para a conservação (*hotspots* de biodiversidade, Myers et al. 2000) ocorrendo nas zonas tropicais das Américas, a maior parte das informações acumuladas sobre os mecanismos de diversificação ainda são provenientes de estudos em regiões temperadas (Beheregaray et al., 2015). De fato, o conhecimento sobre mecanismos e processos responsáveis por moldar a enorme biodiversidade dos Neotrópicos é ainda emergente, mas tem sido beneficiado pelo crescente número de estudos filogenéticos (Antonelli & Sanmartín, 2011; Antonelli et al. 2018) e filogeográficos nas últimas décadas (revisado por Turchetto-Zolet et al. 2013).

Diversos mecanismos bióticos e abióticos têm sido propostos para explicar a evolução da biodiversidade nos Neotrópicos (ver Antonelli & Sanmartin 2011; Hughes et al. 2013). Dentre os mecanismos abióticos, o tempo disponível para eventos de especiação, clima atual e passado, e eventos geológicos como soerguimento de montanhas e mudanças hidrológicas, têm sido frequentemente associados à formação e manutenção da biota neotropical (Antonelli & Sanmartin 2011). Apesar dos processos de diversificação não estarem restritos a um intervalo de tempo particular (Rull 2008, 2011; Antonelli et al. 2018), os eventos geológicos do Terciário e as oscilações climáticas do Quaternário são comumente apontados como períodos importantes para a diversificação entre linhagens intra-específicas e entre espécies proximamente relacionadas nesta região (Turchetto-Zolet et al. 2013). Dentre os eventos geológicos,

sabe-se que o soerguimento dos Andes (cujo pico de elevação ocorreu durante Mioceno tardio, cerca 12 Ma; e início do Pleistoceno, cerca de 4.5 Ma) teve um grande impacto na aceleração das taxas de diversificação do continente sul-americano (Gentry 1982; Hoorn et al., 2010), como documentado numa série de estudos evolutivos com distintos taxa (e.g., Hughes & Eastwood 2006; Chazot et al., 2016; Lagomarsino et al., 2016; Bacon et al., 2018). Outros eventos geológicos, como a formação das cadeiras montanhosas no leste do Brasil (i.e., Serra do Mar e Serra da Mantiqueira) e do planalto central brasileiro no Neogeno também têm sido apontados como eventos importantes para explicar a enorme biodiversidade na região (Lara & Patton 2000; Torres & Ribeiro 2009; Werneck et al. 2012). Além disso, estudos tem demonstrado que oscilações climáticas e transgressões marinhas, particularmente durante a segunda metade do Quaternário, também influenciaram os processos de diversificação nos Neotrópicos ao promover diversas mudanças ambientais (Rull 2011; Turchetto-Zolet et al. 2013).

Estrutura populacional, deriva e adaptação

O balanço entre os distintos fatores evolutivos - deriva, fluxo gênico, mutação e recombinação e seleção natural - levam a variação das frequências alélicas dentro das populações e, conseqüentemente, a estruturação de populações e divergência intra-específica e, eventualmente, especiação. Sob baixo fluxo de genes, populações podem estar geneticamente estruturadas devido a pressões seletivas impostas por condições ambientais contrastantes e/ou simplesmente por deriva genética (Rousset 2013). A distinção de ambos processos, seleção natural e deriva genética, é portanto, um dos grandes desafios da biologia evolutiva, e a contribuição relativa de ambas forças na evolução da vida na Terra tem sido há muito tempo debatida. Embora taxas de diferenciação genética e especiação não estejam sempre relacionadas (Kisel et al 2012; Singhal et al. 2018), populações altamente estruturadas, cuja divergência entre linhagens intra-específicas é considerável, podem eventualmente ser consideradas "espécies incipientes" (i.e., que não completaram o processo de especiação) ou espécies crípticas e representar modelos interessantes para os estudos de filogeografia e especiação.

A filogeografia é uma disciplina situada entre o estudo dos processos microevolutivos e macroevolutivos. Nas três décadas de existência (termo cunhado por Avise et al. 1987), a filogeografia se firmou como um importante elo entre filogenética e genética de populações, fornecendo um avanço conceitual que se situa na fronteira entre essas disciplinas (Avise 2009; Carstens et al. 2012). Métodos de filogeografia permitem

testar hipóteses biogeográficas, descrever a evolução do isolamento reprodutivo entre populações, inferir processos envolvidos na origem, distribuição e manutenção da biodiversidade e também fazer inferências sobre as mudanças temporais no ambiente físico e biótico de uma população, utilizando dados genéticos contemporâneos (Beheregaray 2008). O poder dessa disciplina está justamente em considerar o contexto geográfico da variação dos dados genéticos ao longo de um contínuo entre populações e espécies (Knowles 2004, Hickerson et al. 2010). Essa abordagem permite, portanto, compreender como os processos demográficos determinam a diversidade e estrutura genética dentro das espécies ou em um grupo de espécies relacionadas (Diniz-Filho et al. 2008).

Historicamente, os estudos de genética de populações e filogeografia estiveram restritos a utilização de um pequeno número de marcadores. O surgimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA (*Next Generation Sequencing*; NGS, ou ainda *highthroughput sequencing*), entretanto, elevaram para outro patamar tais estudos, ajudando no entendimento sobre os mecanismos de diversificação, e permitindo que os pesquisadores possam responder uma série de perguntas ecológicas e evolutivas que eram antes intratáveis devido ao número limitado de marcadores moleculares (Seehausen et al. 2014; Andrews et al. 2016). Métodos empregando essas novas tecnologias permitem a descoberta, e genotipagem de centenas a milhares de marcadores SNPs em um único passo (Davey et al. 2011; Andrews et al. 2016). Dentre os vários métodos propostos, o de sequenciamento massivo de fragmentos associados a sítios de restrição (*restriction site associated DNA sequencing*; RAD-seq) (Baird et al. 2008) e derivados (e.g., Pettersen et al. 2012), têm se mostrado bastante promissores, especialmente para organismos não-modelo, que não possuem genomas de referência disponíveis. O aumento da cobertura do genoma desses organismos permitiu não só uma reconstrução mais precisa da história evolutiva, inclusive em grupos cuja radiação é recente (e.g Emerson et al. 2010), mas também a identificação de regiões específicas do DNA que contribuem para o isolamento reprodutivo ou estão envolvidas em processos de adaptação local (Payseur et al. 2016).

Para responder algumas das questões que fundamentam o conhecimento biológico sobre os processos de diversificação, é necessário distinguir a heterogeneidade causada por processos estocásticos (inferida a partir de marcadores neutros) da heterogeneidade causada por processos adaptativos (inferida a partir de marcadores sob

seleção). Enquanto marcadores neutros podem identificar diferenciação significativa entre as populações com base no fluxo limitado de genes ou deriva, marcadores de regiões genômicas sob seleção podem identificar populações localmente adaptadas a um habitat particular (Narum et al. 2013). Por gerar uma grande quantidade de sequências amplamente distribuídas no genoma, as técnicas de sequenciamento RAD permitem a identificação de regiões específicas do DNA que estão sob seleção natural. À medida que estudos de genética de populações e filogeografia se tornam mais genômicos, a tendência é que o estudo de adaptação local envolvendo marcadores sob seleção seja integrado a investigação dos processos demográficos utilizando marcadores neutros (Orsini et al. 2013, Andrews et al. 2016). Um grande número de estudos recentes tem demonstrado o potencial dessas técnicas em mapear características biologicamente importantes que podem fornecer novos *insights* sobre processos ecológicos, em adição as explicações envolvendo processos demográficos (e.g., Zellmer et al. 2012; Roda et al. 2013; Gaither et al. 2015).

Espécie modelo

A família Bromeliaceae (58 gêneros, ca. 3140 espécies) constitui um dos clados mais morfológicamente distinto, ecologicamente diverso e rico em espécies entre as angiospermas de distribuição neotropical (Givnish et al. 2011). A família representa um excelente exemplo de radiação adaptativa em plantas vasculares, ocupando uma grande variedade de nichos, nos extremos de umidade, altitude e exposição (Benzing 2000; Crayn et al. 2004; Givnish, 2015). Esse cenário de radiação recente das bromélias fornece um excelente modelo para estudar a divergência entre populações (e.g., Sarthou et al. 2001; Palma-Silva et al. 2009; Hmeljevski et al. 2017; Leal et al. 2018), bem como para examinar a possível existência de fluxo gênico entre espécies simpátricas de plantas (e.g., Palma-Silva et al. 2011; Zanella et al 2016; Neri et al 2017; Mota et al. 2018).

Nesta tese, utilizamos uma espécie herbácea e perene do gênero *Pitcairnia* (Bromeliaceae) como modelo para estudar os padrões e processos que governam a diversidade nos Neotrópicos. *Pitcairnia lanuginosa* Ruiz & Pav. (*sensu* Smith & Downs, 1974) está distribuída principalmente no Cerrado brasileiro e na porção central dos Yungas andinos (Bolívia e Peru), mas também são encontradas sobre afloramentos rochosos azonais localizados entre esses dois biomas/ecorregiões (Figura 1). Forzza et

al. (2018) reconheceram espécimes ocorrendo em território brasileiro como *P. burchellii* Mez (amplamente distribuída no Cerrado) e *P. caldasiana* Baker (rara e restrita ao estado de Minas Gerais) na Flora do Brasil, restringido a ocorrência de *P. lanuginosa* aos países vizinhos Bolívia e Peru. Neste trabalho, porém, incluímos uma amostragem de populações ocorrendo no Brasil e Peru e adotamos o tratamento de Smith & Downs 1974, que sinonimiza todos os nomes a *P. lanuginosa*, devido a ausência de variações morfológicas óbvias para separar os espécimes.

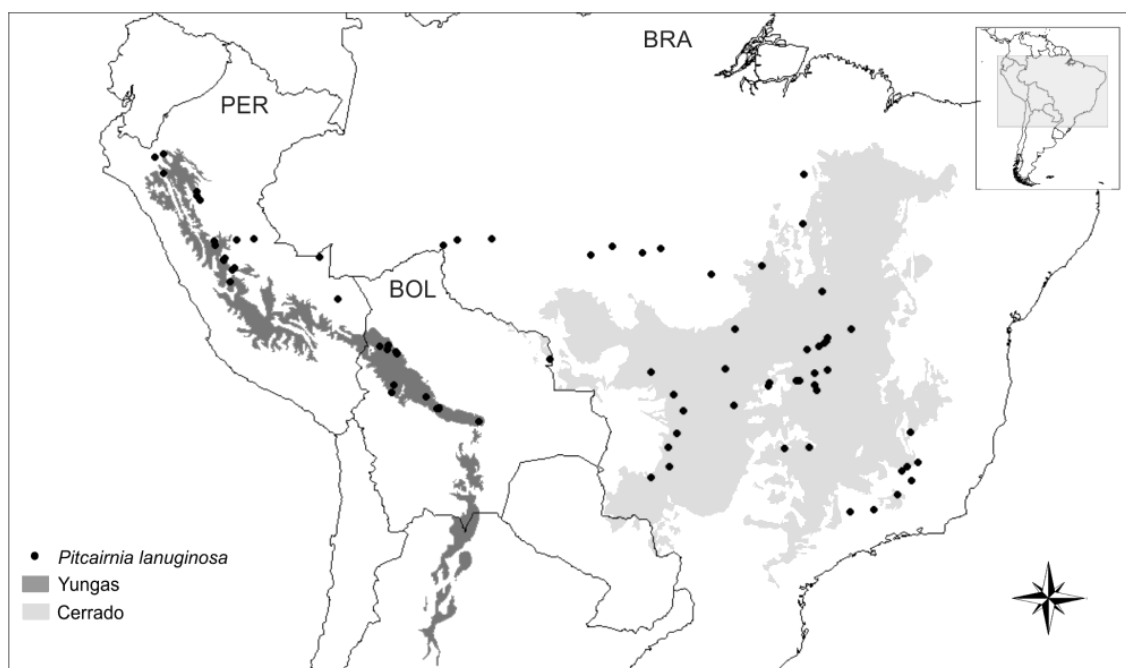


Figura 1. Distribuição de *Pitcairnia lanuginosa* (Bromeliaceae) conforme registros obtidos em herbários. Acrônimos para os países: BOL=Bolívia, BRA=Brasil; PER=Peru. Delimitação dos biomas/ecorregiões segue a proposta de Olson et al. (2001).

Pitcairnia lanuginosa é geralmente encontrada em matas de galeria (ou matas ripárias), sobre rochas ou barrancos localizados próximo a cachoeiras ou margens de cursos d'água (Figura 2). A espécie possui flores branco-amareladas com manchas vináceas, corola tubular, abundante produção de néctar e flores com antese noturna (Figura 2). Ao longo da realização desse trabalho, observamos que a fenologia floral das plantas mantidas sob cultivo em casa de vegetação não é sincronizada entre populações, com picos de floração concentrados na primavera ou outono (Figura 3). Além disso, verificamos por meio de experimentos de cruzamentos manuais em casa de vegetação que a espécie apresenta altíssimas taxas de auto-polinização espontânea (Tabela 1). Estudos recentes demonstraram que a espécie é notadamente tolerante a dessecação, e

reconheceram que se tratam de plantas revivescentes (Vieira et al, 2017a,b). Esta característica é relativamente rara em angiospermas (Oliver & Mishler 2000; Porembski & Barthlott 2000; Gaff & Oliver 2013) e parece determinada pela presença de mecanismos de proteção únicos que estão constantemente ativos (Alamillo et al. 1995; Gechev et al. 2012). Tais características biológicas, acoplada com a distribuição geográfica ampla e naturalmente fragmentada, tornam *P. lanuginosa* um interessante modelo para explorar os padrões de diversidade e estrutura genética, e para avaliar a importância da adaptação local como fator de divergência entre linhagens.

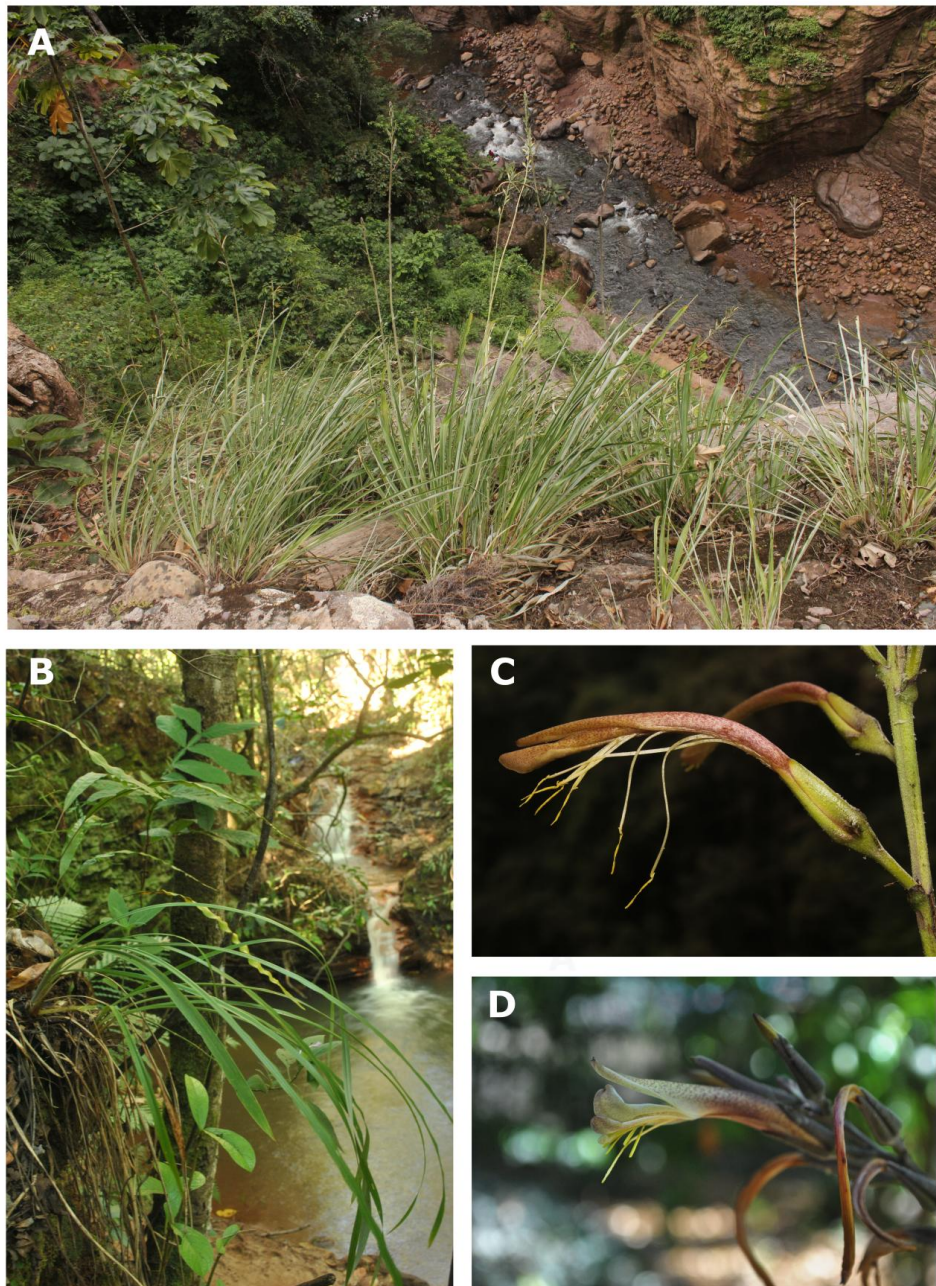


Figura 2. Hábito (A-B) e morfologia floral (C-D) de *Pitcairnia lanuginosa*.

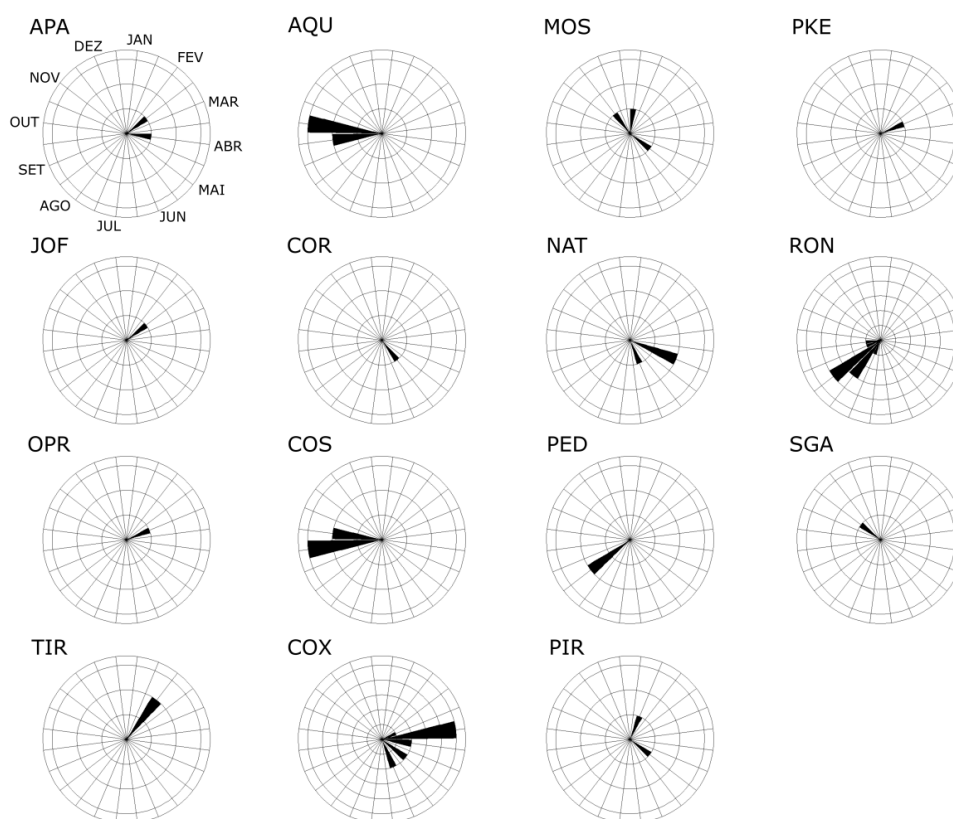


Figura 3. Variação do pico de floração de indivíduos coletados em 15 populações de *Pitcairnia lanuginosa* mantidos em cultivo em casa de vegetação na UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Dados não publicados.

Tabela 1. Resultados dos experimentos de cruzamento realizados em 2015 em indivíduos de *Pitcairnia lanuginosa* provenientes de uma mesma população e cultivados em casa de vegetação na UNESP, Rio Claro, Brasil. N = número de flores por tratamento. Dados não publicados.

Tratamento	N	Produção de frutos (%)	Taxa de germinação média (%)
Auto-polinização espontânea	21	86 (18/21)	18%
Auto-polinização manual	17	100 (17/17)	11.30%
Polinização cruzada	19	100 (3/3)*	4%
Emasculação	12	0	-

*Maioria das flores submetidas ao tratamento foram abortadas precocemente.

Além de revisar estudos de filogeografia realizados com espécies de plantas no território brasileiro e sumarizar o conhecimento sobre padrões e processos de

diversificação em cada bioma brasileiro (CAPÍTULO 1), nesta tese respondemos as seguintes questões associadas ao nosso modelo de estudo integrando diferentes abordagens metodológicas:

- (1) Populações de *P. lanuginosa* distribuídas nos biomas/ecorregiões sul-americanos, Yungas e Cerrado, representam duas linhagens geneticamente divergentes? A atual distribuição pode ser explicada por vicariância ou dispersão? (CAPÍTULO 2);
- (2) Qual o papel das oscilações climáticas do Pleistoceno sobre os padrões de variação genética do complexo? (CAPÍTULO 2);
- (3) Qual o papel relativo dos processos estocásticos e adaptativos na divergência de linhagens e na colonização de ambientes méxicos do Cerrado? (CAPÍTULO 3).

Para responder essas questões, reconstruímos a história evolutiva da espécie *P. lanuginosa* utilizando duas diferentes abordagens. Inicialmente, integramos métodos tradicionais a partir de sequenciamento de Sanger com marcadores universais e genotipagem de marcadores microssalélites, e modelos de distribuição de espécies (SDMs) para verificar o papel dos processos demográficos históricos sobre a variação genética neutra de *P. lanuginosa*. Em seguida, genotipamos centenas de SNPs sequenciados por ddRAD (Peterson et al. 2012), para investigar os papéis relativos de deriva e da seleção na estruturação genética da espécie. Na tentativa de agregar conhecimento biológico importante para interpretar os padrões encontrados também levantamos informações sobre caracteres fenotípicos potencialmente associados a adaptação a seca e a altas temperaturas. Padrões de diversificação de espécies herbáceas associadas a matas de galeria, como *P. lanuginosa*, ainda são pouco conhecidos na região neotropical, e podem ajudar a traçar um panorama geral da história da biogeografia do continente sul-americano.

REFERÊNCIAS

- Alamillo J, Almoguera C, Bartels D, Jordano J. 1995. Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 29: 1093–1099.
- Antonelli A, Ariza M, Albert J, Andermann T, Azevedo J, Bacon C, ... , Matos-Maraví P. 2018. Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. *PeerJ* 6: e5644
- Antonelli A, Sanmartín I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60: 403–414
- Avice JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3–15.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, ... , Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- Bacon CD, Velásquez-Puentes FJ, Hoorn C, Antonelli A. 2018. Iriarteeae palms tracked the uplift of Andean Cordilleras. *Journal of Biogeography* 45: 1653–1663.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS One* 3: e3376.
- Beheregaray LB. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17: 3754–3774.
- Beheregaray LB, Cooke GM, Chao NL, Landguth EL. 2015. Ecological speciation in the tropics: insights from comparative genetic studies in Amazonia. *Frontiers in Genetics* 5: 477.
- Benzing DH. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Carstens B, Lemmon AR, Lemmon EM. 2012. The promises and pitfalls of next-generation sequencing data in phylogeography. *Systematic Biology* 61: 713–715.
- Chazot N, Willmott KR, Condamine FL, De-Silva DL, Freitas AVL, Lamas G, Morlon H, Giraldo CE, Jiggins CD, Joron M, Mallet J, Uribe S, Elias M. 2016. Into the Andes: multiple independent colonizations drive montane diversity in the Neotropical clearwing butterflies *Godyridina*. *Molecular Ecology* 25: 5765–5784.

- Craig JM, Malabarba LR, Crampton WGR, Albert JS. 2018. Revision of banded knifefishes of the *Gymnotus carapo* and *G. tigre* clades (Gymnotidae Gymnotiformes) from the Southern Neotropics. *Zootaxa* 4379: 47–73.
- Crayn DM, Winter K, Smith JAC. 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3703–3708.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12: 499–510.
- Diniz-Filho JAF, Telles MPC, Bonatto SL, Eizirik E, Freitas TRO, Marco-Jr P, Santos FR, Sole-Cava A, Soares TN. 2008. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography* 35: 753–763.
- Emerson KJ, Merz CR, Catchen JM, Hohenlohe PA, Cresko WA, Bradshaw WE, Holzapfel CM. 2010. Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 16196–16200.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B. 2018. Bromeliaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Último acesso: 10 Nov 2018.
- Gaither MR, Bernal MA, Coleman RR, Bowen BW, Jones SA, Simison WB, Rocha LA. 2015. Genomic signatures of geographic isolation and natural selection in coral reef fishes. *Molecular Ecology* 24: 1543–1557.
- Gaff DF, Oliver M. 2013. The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Functional Plant Biology* 40: 315–328.
- Gechev TS, Dinakar C, Benina M, Toneva V, Bartels D. 2012. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in resurrection plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3175–3186.
- Gentry AH. 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 69: 557–593.

- Givnish TJ. 2015. Adaptive radiation versus “radiation” and “explosive diversification”: why conceptual distinctions are fundamental to understanding evolution. *New Phytologist* 207: 297–303.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98: 872–895.
- Hickerson MJ, Carstens BC., Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, ... , Yoder AD. 2010. Phylogeography’s past, present, and future: 10 years after *Avice*, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291–301.
- Hmeljevski KV, Nazareno AG, Bueno M, Reis MS, Forzza RC. 2017. Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. *Ecology and Evolution* 7: 4704–4716
- Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartin I, Sanchez-Meseguer A, Anderson CL, Figueiredo JP, Jaramillo C, Riff D, Negri FR, Hooghiemstra H, Lundberg J, Stadler T, Sarkinen T, Antonelli A. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330: 927–931.
- Hughes CE, Eastwood R. 2006. Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:10334–10339.
- Hughes CE, Pennington RT, Antonelli A. 2013. Neotropical plant evolution: assembling the big picture. *Botanical Journal of the Linnean Society* 171:1–18.
- Humboldt A. 1820. *Voyage aux regions equinoxiales du Nouveau Continent*. Paris: N. Mazé.
- Knowles LL. 2004. The burgeoning field of statistical phylogeography. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1–10.
- Kisel Y, Moreno-Letelier AC, Bogarín D, Powell MP, Chase MW & Barraclough TG. 2012. Testing the link between population genetic differentiation and clade diversification in Costa Rican orchids. *Evolution* 66: 3035–3052

- Lagomarsino LP, Condamine FL, Antonelli A, Mulch A, Davis CA. 2016. The abiotic and biotic drivers of rapid diversification in Andean bellflowers (Campanulaceae). *New Phytologist* 210:1430–1442.
- Lara MC, Patton JL. 2000. Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society* 130: 661–686.
- Leal BSS, Medeiros LR, Peres EA, Sobral-Souza T, Palma-Silva C, Romero GQ, Carareto CM. 2018. Insights into the evolutionary dynamics of Neotropical biomes from the phylogeography and paleodistribution modeling of *Bromelia balansae*. *American Journal of Botany*, 105: 1–10.
- Lundberg JG, Kottelat M, Smith GR, Stiassny MLJ, Gill AC. 2000. So manyfishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87: 26–62.
- McCormack JE, Maley JM, Hird SM, Derryberry EP, Graves GR, Brumfield RT. 2012. Next-generation sequencing reveals phylogeographic structure and a species tree for recent bird divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 397–406.
- Mittermeier RA, Turner WR, Larsen FW, Brooks TM, Gascon C. 2011. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In *Biodiversity hotspots* (pp. 3–22). Springer: Berlin.
- Morrone JJ. 2013. Cladistic biogeography of the neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics* 30: 202–214.
- Mota MR, Pinheiro F, Leal BSS, Wendt T, Palma-Silva C. 2018. The role of hybridization and introgression in maintaining species integrity and cohesion in naturally isolated inselberg bromeliad populations. *Plant Biology*, in press.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Neri J, Wendt T, Palma-Silva C. 2017. Natural hybridization and genetic and morphological variation between two epiphytic bromeliads. *AoB Plants* 10: plx061.
- Narum SR, Buerkle CA, Davey JW, Miller MR, Hohenlohe PA. 2013. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular Ecology* 22: 2841–2847.
- Oliver MJ, Mishler BD. 2000. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* 151: 85–100.

- Orsini L, Andrew R, Eizaguirre C. 2013. Evolutionary ecological genomics. *Molecular Ecology* 22: 527-531.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- Payseur BA, Rieseberg LH. 2016. A genomic perspective on hybridization and speciation. *Molecular Ecology* 25: 2337–2360.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one* 7: e37135.
- Porembski S, Barthlott W. 2000. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151: 19–28.
- Roda F, Ambrose L, Walter GM, Liu HL, Schaul A, Lowe A, Pelser PB, Prentis P, Rieseberg LH, Ortiz-Barrientos D. 2013. Genomic evidence for the parallel evolution of coastal forms in the *Senecio lautus* complex. *Molecular Ecology* 22: 2941–2952.
- Rousset F. 2013. Genetic structure and selection in subdivided populations (MPB-40) (Vol. 63). Princeton: Princeton University Press.
- Rull V. 2008. Speciation timing and Neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology* 17: 2722–2729.
- Rull V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 508–513.
- Sarthou C, Samadi S, Boisselier-Dubayle M-C. 2001. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88: 861–868.
- Seehausen O, Butlin RK, Keller I, Wagner CE, Boughman JW, Hohenlohe PA, ... , Brelsford A. 2014. Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics* 15: 176.
- Singhal S, Huang H, Grundler MR, Marchán-Rivadeneira MR, Holmes R, Title PO, Donnellan SC, Rabosky DL. 2018. Does population structure predict the rate of speciation? A comparative test across Australia's most diverse vertebrate radiation. *The American Naturalist* 192: 432-447.

- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph 14: 1- 658.
- Torres RA, Ribeiro J. 2009. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. *Hydrobiologia* 617: 157–170.
- 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.
- Vieira EA, Centeno DC, Freschi L, Silva EA, Braga MR. (2017a) The dual strategy of the bromeliad *Pitcairnia burchellii* Mez to cope with desiccation. *Environmental and Experimental Botany* 143: 135-148.
- Vieira EA, Silva KR, Oriani A, Moro CF, Braga MR. 2017b. Mechanisms of desiccation tolerance in the bromeliad *Pitcairnia burchellii* Mez: biochemical adjustments and structural changes. *Plant Physiology and Biochemistry* 121: 21-30.
- Werneck FP, Gamble T, Colli GR, Rodrigues MT, Sites-Jr JW. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the South American ‘dry diagonal’: integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution* 66: 3014-3034.
- 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.
- Zellmer AJ, Hanes MM, Hird SM, Carstens BC. 2012. Deep phylogeographic structure and environmental differentiation in the carnivorous plant *Sarracenia alata*. *Systematic Biology* 61: 763–777.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento sobre os processos envolvidos na diversificação da biota neotropical tem se beneficiado pelo número crescente de estudos microevolutivos (a nível populacional) com espécies ecologicamente diversas e pela emergência de novas tecnologias de sequenciamento e de métodos que estenderam seu uso à organismos não-modelo. Esta tese reúne três manuscritos que agregam informações sobre fatores históricos e ecológicos que afetam a distribuição geográfica e estrutura genética de populações ao revisar estudos filogeográficos de plantas no Brasil e gerar novos dados empíricos sobre uma espécie herbácea de ampla distribuição nos Neotrópicos, com populações pequenas e isoladas, *Pitcairnia lanuginosa* (Bromeliaceae). Em conjunto com estudos de genética/genômica de populações e filogeografia de outros organismos, as informações aqui geradas ajudam a esclarecer os processos complexos responsáveis pela origem e manutenção da biodiversidade dos Neotrópicos.

Muitos obstáculos a pesquisa da biodiversidade ainda limitam nosso conhecimento sobre a evolução da flora e fauna neotropical. Embora o estudo dos mecanismos e processos de diversificação nos Neotrópicos seja desafiador, nós argumentamos que esforços futuros deverão ser direcionados de forma a: (a) aumentar os estudos com grupos poucos estudados, ou com características ecológicas distintas, (b) expandir o uso de dados genômicos, (c) integrar informações moleculares com outros tipos de dados, como morfologia, fisiologia e ecologia, e (d) cobrir áreas geográficas pouco amostradas. Ainda, argumentamos que o acúmulo de dados empíricos independentes e a síntese das informações acumuladas por meio de revisões e meta-análises tem o potencial de ressaltar padrões biogeográficos gerais em meio ao aparente cenário de complexidade que caracteriza a evolução nos Neotrópicos.