

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FILOGEOGRAFIA DE CINCO ESPÉCIES DE *DYCKIA* (BROMELIACEAE)  
ENDÊMICAS DE UMA REGIÃO DO CENTRO-OESTE BRASILEIRO, QUE  
COMPREENDE OS BIOMAS CERRADO, PANTANAL E CHACO, EM  
COMPARAÇÃO COM UMA CONGÊNERE AMPLAMENTE DISTRIBUÍDA



CAMILA DE AGUIAR MELO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2016

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS**

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

FILOGEOGRAFIA DE CINCO ESPÉCIES DE *DYCKIA* (BROMELIACEAE)  
ENDÊMICAS DE UMA REGIÃO DO CENTRO-OESTE BRASILEIRO, QUE  
COMPREENDE OS BIOMAS CERRADO, PANTANAL E CHACO, EM  
COMPARAÇÃO COM UMA CONGÊNERE AMPLAMENTE DISTRIBUÍDA.

Camila de Aguiar Melo

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda Bered

Coorientadora: Dra. Camila Martini Zanella

Porto Alegre

Março de 2016

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, no Laboratório de Genética Vegetal, Departamento de Genética da UFRGS, Porto Alegre, Brasil. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ - 457698/2014-4 e Ação Transversal nº6/2011 — Casadinho/Procad), e pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (11/2014 – Universal-MS). A mestranda obteve bolsa de estudos do CNPQ (24 meses).

Dedico este trabalho, aos meus pais, Sandra e Carlinhos, por todo amor,  
confiança, paciência e apoio incondicional nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela proteção e inspiração.

À minha Orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda Bered, pela orientação, dedicação, compreensão, incentivo, paciência, carinho e por todos os conselhos e ensinamentos, muito obrigada.

À minha Coorientadora, Camila Martini Zanella, pela dedicação, disponibilidade, compreensão, incentivo, amizade, pelos conselhos e inúmeros ensinamentos, desde a coleta em campo e procedimentos laboratoriais até as análises de computador e a compreensão de conteúdos, muito obrigada.

Aos meus pais, Sandra e Carlinhos, e ao meu irmão Felipe que são os “pilares sólidos” da minha vida, pelo amor e apoio incondicional nesta jornada, muito obrigada.

À minha Vó Rosa pelas orações e preocupações, e a minha Dinda Adriana e minha Tia Carmem (Caca) pelo auxílio e incentivo, muito obrigada.

À Luiza Domingues Hirsch, pela amizade, convivência, companheirismo, auxílio, aprendizados, risadas e conversas, muito obrigada.

Às colegas, Thiana pelas conversas e momentos de descontração, Roberta pelas conversas e desabafos e Nicole pela atenção de sempre.

Ao Grupo de Genética e Conservação de Plantas, Luiza, Laís e Cristina pela convivência.

A Gecele Paggi, pela parceria, informações das espécies de *Dyckia* no MS, e pela hospedagem em Corumbá nos dias de coleta.

Ao Seu Walter Kranz pelo auxílio com as coletas em Mato Grosso do Sul e Paraná, pela disponibilidade das informações sobre *Dyckia*, e juntamente com sua esposa Emília pela hospedagem em Londrina.

Ao José pelo auxílio no acondicionamento das amostras.

À Márcia Goetze pela ajuda com o material de estudos para a prova de mestrado, assim como com as compreensões das análises com o marcador nuclear.

Aos queridos professores da UNISC, Chana de Medeiros da Silva, Marisa Putzke e Alexandre Rieger, pelo incentivo de continuar os estudos e pelas conversas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade em realizar o mestrado e pelo apoio financeiro para realizar esta dissertação.

Aos Professores do PPGBM pelas aulas e conhecimentos transmitidos.

Ao Elmo, pelo suporte burocrático, pela atenção, paciência e auxílio na solução de problemas.

Ao Seu Neuso e a Dona Izabel pela atenção, convivência e carinho; tornando de um apartamento alugado um lar muito especial.

Aos guarda-parques e a bióloga do Parque Natural Morro do Osso em Porto Alegre - RS, pela atenção e auxílio nas coletas, assim como todas as pessoas que através de e-mail ou auxiliando diretamente no campo contribuíram com as coletas realizadas neste trabalho.

Ao Cnpq pela bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
1.1 Família Bromeliaceae.....	13
1.2 Gênero <i>Dyckia</i> Schult. & Schult. f.....	14
1.2.1 Características gerais e distribuição das espécies de <i>Dyckia</i> estudadas.....	15
1.3 Estado do Mato Grosso do Sul: Região Centro-oeste do Brasil que compreende diferentes biomas.....	18
1.4 Espécies restritas vs amplamente distribuídas e os estudos filogeográficos.....	20
1.5 Objetivos.....	21
1.5.1 Objetivos Específicos.....	22
<b>CAPÍTULO II</b> .....	23
Phylogeography of five related <i>Dyckia</i> (Bromeliaceae) species endemic from Midwest of Brazil in comparison with widespread congener .....	24
<b>CAPÍTULO III</b> .....	61
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	62
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

## RESUMO

A Família Bromeliaceae abriga espécies de plantas epífitas, saxícolas ou terrestres, que se distribuem do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, compreendendo 58 gêneros e em torno de 3140 espécies. É uma das famílias mais diversas ecológica e morfológicamente, tendo surgido no escudo das Guianas há aproximadamente 100 milhões de anos (Ma), e se espalhado por outras regiões das Américas tropical e subtropical em torno de 15 e 10 Ma. O gênero *Dyckia* apresenta aproximadamente 160 espécies, sendo muitas destas raras e endêmicas. Este gênero é caracterizado pela ausência de “tanque” que acumula água, possibilitando a essas espécies habitar ambientes com condições de seca extrema, como a diagonal seca no centro da América do Sul. O estado do Mato Grosso do Sul, inserido na diagonal seca, tem na sua composição fitogeográfica quatro biomas (Cerrado, Pantanal, Chaco e Mata Atlântica), sendo uma área muito interessante para estudos filogeográficos. Esta dissertação é composta por um manuscrito que busca entender a diversidade genética e a história evolutiva de cinco espécies de *Dyckia* restritas e endêmicas de uma região que compreende diferentes biomas em comparação com uma congênere de ampla distribuição. No Capítulo II, através de uma abordagem filogeográfica, utilizando dois marcadores plastidiais (cpDNA) e um nuclear (nuDNA), foi estimada a diversidade genética dentro e entre cinco espécies de *Dyckia* de distribuição restrita (*D. grandidentata*, *D. pottiorum*, *D. divaricata*, *D. excelsa* e *D. exserta*), endêmicas do Cerrado e do Pantanal/Chaco, em comparação com a congênere de ampla distribuição (*D. leptostachya*). Os resultados do cpDNA revelaram que as espécies de distribuição restrita apresentaram uma baixa diversidade genética intra populacional em comparação com a congênere de ampla distribuição, entretanto a diversidade apresentada pelas populações da espécie amplamente distribuída não foi considerada alta, sendo que somente quatro populações apresentaram variação genética. Quando levado em consideração a diversidade total das espécies, os índices de diversidade nas espécies de distribuição restrita variaram de zero à 0,7355 (h) e 0,000988 ( $\pi$ ), e quando comparadas com a espécie amplamente distribuída apresentaram menor diversidade, com exceção de *Dyckia excelsa*, sendo que a alta diversidade desta espécie pode estar relacionada a sua característica de auto incompatibilidade. Os resultados obtidos a partir do nuDNA mostraram uma rede de haplótipos levemente estruturada e uma alta diversidade genética em comparação ao cpDNA, devendo-se provavelmente a alta taxa de recombinação, à alta dispersão via pólen



ou ainda à retenção de polimorfismo ancestral. Os resultados de cpDNA apresentaram um baixo compartilhamento de haplótipos e uma alta estruturação, sendo que os haplótipos compartilhados entre *D. grandidentata*, *D. pottiorum* e *D. divaricata* (H1, H3), e entre as populações de *D. leptostachya* (H5) são provavelmente consequência da retenção de polimorfismo ancestral. O relacionamento genético apresentado pela rede haplotípica do cpDNA evidencia três haplogrupos, um formado pela espécie amplamente distribuída, e os outros dois pelas espécies que ocorrem no Cerrado e no Pantanal/Chaco, indicando que a história biogeográfica destes biomas pode ter influenciado em processos de especiação deste grupo de espécies. A Serra de Maracaju e a diferença na elevação do solo do Cerrado em relação à planície do Pantanal, foram propostas como a principal barreira geográfica que gerou a alta estruturação entre os haplogrupos formados pelas espécies ocorrentes no Cerrado e Pantanal/Chaco. Assim, a preservação dos biomas é vital para a conservação tanto das espécies de *Dyckia* de distribuição restrita quanto das amplamente distribuídas, garantindo a manutenção da exclusiva diversidade destas populações.

## ABSTRACT

Bromeliaceae family harbors species of epiphytic, saxicol or land plants, which are distributed from the southern of United States to Patagonia, comprising 58 genera with about 3140 species. It is one of the most diverse ecological and morphologically families that arose in the Guiana Shield about 100 million years ago (Ma), and spread to other regions of the tropical and subtropical Americas around 15 to 10 Ma. *Dyckia* genus has about 160 species, many of these rare and endemic. This genus is characterized by the absence of a "tank" that accumulates water, enabling these species to inhabit environments with extreme drought conditions, such as "the dry diagonal" in the center of South America. The state of Mato Grosso do Sul, located on dry diagonal, comprises four biomes (Cerrado, Pantanal, Chaco and Atlantic Forest), being one interesting area for phylogeographic studies. This dissertation is composed by one manuscript that seeks to understand the genetic diversity and evolutionary history of five restricted and endemic species from *Dyckia* genus in a region comprising different biomes, compared with a wide distributed congener. In Chapter II, through a phylogeographic approach, using two plastid markers (cpDNA) and one nuclear (nuDNA), we estimated the genetic diversity within and among *Dyckia grandidentata*, *D. pottiorum*, *D. divaricata*, *D. excelsa* and *D. exserta* (restricted species endemic to the Cerrado and the Pantanal / Chaco), comparing with a congener with wide distribution (*D. leptostachya*). The results from cpDNA showed that restricted distributed species had low intra-populational genetic diversity in comparison with the species widely distributed. However, the diversity presented by the widely distributed species was not considered high, since only four populations showed genetic variation. Considering the total diversity, the restricted distribution species ranged from zero to 0,7355 (h) and 0,000988 ( $\pi$ ), and when compared with widespread species showed minor diversity. The exception was *Dyckia excelsa* that showed high diversity, fact that could be related with its self incompatibility. The results obtained from nuDNA showed a slightly structured network and a high genetic diversity compared to cpDNA, which may be probably due to high recombination rates, the high dispersion via pollen or the retention of ancestor polymorphism. Also, the cpDNA results showed a low haplotype sharing and high structure, and shared haplotype between *D. grandidentata*, *D. pottiorum* and *D. divaricata* (H1, H3) and populations of *D. leptostachya* (H5) may be consequence of retention of ancestral polymorphism. The genetic relationship presented by cpDNA

haplotype network reveals three haplogroups, one formed by widespread species, and the others by species that occur in Cerrado and in Pantanal / Chaco, indicating that biogeographic history of these biomes may have influenced speciation of this group of species. Serra de Maracaju and the differences in landscape elevation between Cerrado and Pantanal lowland was proposed as the main geographical barrier that generated the high structure between the haplogroups formed by species from Cerrado and Pantanal/Chaco. Thus, the preservation of biomes is imperative for the conservation of *Dyckia* species, ensuring the maintenance of that exclusive diversity encountered in these populations.

## Capítulo I

### Introdução Geral

---

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae apresenta plantas epífitas, saxícolas ou terrestres que podem habitar desde ambientes extremamente secos até matas densas, sendo considerada uma das famílias mais diversas ecológica e morfológicamente. Quanto a distribuição geográfica, são plantas quase que exclusivamente Americanas, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos (estados do Texas, Virgínia e Califórnia) até o norte da Patagônia na Argentina (Benzing, 2000; Givnish *et al.*, 2011). A exceção é a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr que ocorre no Oeste da África, provavelmente devido a um evento recente de dispersão à longa distância (Givnish *et al.*, 2011).

Bromeliaceae apresenta em torno de 3140 espécies distribuídas em 58 gêneros (Givnish *et al.*, 2014), e estava dividida tradicionalmente em três subfamílias: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Smith e Downs, 1974). No entanto, estudos filogenéticos realizados com o marcador plastidial *ndhF* propuseram uma nova classificação, indicando que a subfamília Pitcairnioideae é parafilética e propondo assim a divisão da família Bromeliaceae em oito subfamílias: (Brocchinioideae, (Lindmanioideae, (Tillandsioideae, (Hechtioideae, (Navioideae, (Pitcairnioideae, (Puyoideae, Bromelioideae)))))) (Givnish *et al.*, 2007; 2011). Segundo Givnish *et al.* (2011), as bromélias surgiram no Escudo das Guianas há cerca de 100 milhões de anos atrás (Ma) durante o Período Cretáceo, com as subfamílias existentes começando a divergir há apenas 19Ma. Os mesmo autores sugerem que as bromélias começaram a ocupar os Andes, a Amazônia, a América Central, o Caribe e o Escudo brasileiro entre 15 e 10 Ma, e a região da África há cerca de 9,3 Ma.

As inovações apresentadas pelas bromélias ao longo do tempo, tais como o epifitismo, a formação de um “tanque” através da disposição das folhas servindo como habitat para muitos organismos, a capacidade dos tricomas foliares de absorver água e nutrientes, a polinização pelas aves e o surgimento do sistema CAM de fotossíntese (metabolismo ácido das crassuláceas), permitiram a essas plantas invadirem novos ambientes, como florestas pluviais, topo de árvores e ambientes xéricos, além de ocasionarem uma extensiva especiação (Givnish *et al.*, 2014). São considerados quatro centros de diversidade para a família, os Andes, a América Central, o Planalto das Guianas,

e o Escudo brasileiro (Smith e Downs, 1974; Givinish *et al.*, 2014). Estima-se que cerca de 50% do total de espécies da família possa ser encontrado no Brasil, colocando o país como um dos mais importantes em termos de diversidade de bromélias (Leme e Marigo, 1993).

As Bromélias evoluíram uma ampla variedade de arranjos florais com grande diversidade de cores, formas e aromas, atraindo uma ampla gama de polinizadores, desde diferentes insetos, morcegos, beija-flores, dentre outras aves. Assim, ecologicamente, além do néctar gerado aos polinizadores, as bromélias são importantes fontes de frutos carnosos, de água acumulada nos tanques formados pelas folhas, e de abrigo para animais associados, como mamíferos, anfíbios, pássaros e insetos (Benzing, 2000).

Além da importância ecológica, algumas espécies têm importância econômica, com propriedades medicinais, como a *Bromelia antiacantha* Bertol., muito utilizada na cultura popular para a obtenção de xaropes caseiros através de seus frutos; na fruticultura, como o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill); e muitas outras espécies com valor ornamental (Zanella *et al.*, 2012).

## 1.2 Gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f.

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. composto por aproximadamente 160 espécies, juntamente com os gêneros *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (~27 espécies), *Deuterocohnia* Mez (~17 espécies), *Fosterella* L.B Smith (~31 espécies) e *Pitcairnia* L'Hér (~400 espécies) pertencem à subfamília Pitcairnioideae (Krapp *et al.*, 2014). As espécies de *Dyckia* são plantas perenes, de hábito terrestre ou saxícola, nas quais não se observa a formação de um tanque para o acúmulo de água (particularidade observada na maioria das espécies de Bromeliaceae), característica essa que possibilitou ao gênero sobreviver em ambientes xeromórficos. As folhas em roseta são usualmente coriáceas com espinhos marginais apresentando diferentes níveis de suculência, as inflorescências podem ser simples ou ramificadas e inseridas lateralmente. As flores podem ser sésseis ou pediceladas, e as cores das pétalas, sépalas e inflorescência variam desde o vermelho, laranja ao amarelo (Smith e Downs, 1974; Krapp *et al.*, 2014). As sementes são normalmente dispersas pelo vento, ou pela água no caso de algumas espécies adaptadas a ambientes periodicamente inundados, como a reofítica, *D. brevifolia* Baker (Leme *et al.*, 2012). Apresenta como polinizadores principais os beija-flores, mas insetos como abelhas

e borboletas também já foram relatados (Rogalscki *et al.*, 2009; Vosgueritchian e Buzato, 2006).

As relações filogenéticas dentro da subfamília Pitcairnioideae mostram um clado xérico formado pelos gêneros *Dyckia*, *Encholirium* e *Deuterocohnia*. Estes apresentam folhas suculentas e fortemente aculeadas adaptadas aos ambientes de seca ocorrentes na América do Sul (Santos-Silva *et al.*, 2013). Segundo Krapp *et al.* (2014), o ancestral dos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* teria se separado de *Deuterocohnia* entre 8,5 e 5,6 Ma, migrando dos Andes (Bolívia) para o leste, no Brasil central, onde teria iniciado uma radiação entre 5,6 e 4,6 Ma. Ainda segundo os mesmo autores, a separação dos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* teria ocorrido na região central do Brasil entre 4,6 e 4,1 Ma, ocorrendo a migração do gênero *Dyckia* em direção ao sul do País, e há 2,5 Ma um segundo evento de radiação teria provocado a expansão do gênero para as demais áreas onde atualmente é encontrado. O gênero *Dyckia* ocorre hoje no Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. No Brasil são encontradas 83% das espécies conhecidas, com distribuição que vai desde o nível do mar até 1000 metros de altitude (Leme *et al.*, 2012). Ambientes típicos de ocorrência de *Dyckia* são secos e pedregosos, com solos pobres e com falta de nutrientes, além de alta incidência solar. O centro de diversidade de *Dyckia* ocorre nas regiões montanhosas do Brasil central, delimitado pela Mata Atlântica e Caatinga no leste e pelo Chaco no Oeste. (Krapp *et al.*, 2014).

### 1.2.1 Características gerais e distribuição das espécies de *Dyckia* estudadas

No presente trabalho foram estudadas seis espécies de plantas do gênero *Dyckia* (Figura 1), sendo cinco delas consideradas de distribuição geográfica restrita e uma amplamente distribuída:

*Dyckia grandidentata* Braun, P.J & E é uma planta rupícola em forma de roseta com até 37 centímetros de diâmetro, as folhas são levemente coriáceas, glabras, suculentas e com margem serrada, o pedúnculo é ereto ou levemente sinuoso e apresenta em torno de 40 centímetros (cm), a inflorescência é ereta de cor rosa escuro, tornando-se laranja e vermelho próximo ao ápice, as flores variam do laranja ao amarelo, e o fruto é uma cápsula ovoide. A espécie ocorre nas regiões montanhosas do estado do Mato Grosso do Sul (MS) entre as cidades de Aquidauana e Coxim (Figura 2) (Braun e Pereira, 2008).

*Dyckia pottiorum* Leme é uma espécie saxícola e levemente prostada, apresenta folhas com arranjo dístico, coriáceas e margem serreada, pedúnculo ereto variando de 10 à 34 cm e inflorescência ereta densamente florida e laranja em direção ao ápice. Possui de 11 a 18 flores variando do laranja ao laranja amarelado. Foi recentemente descrita e descoberta no estado do Mato Grosso do Sul na cidade de Corguinho (Leme *et al.*, 2012), sendo que neste trabalho também foi coletada uma população na cidade de Aquidauana (MS) (Figura 2).

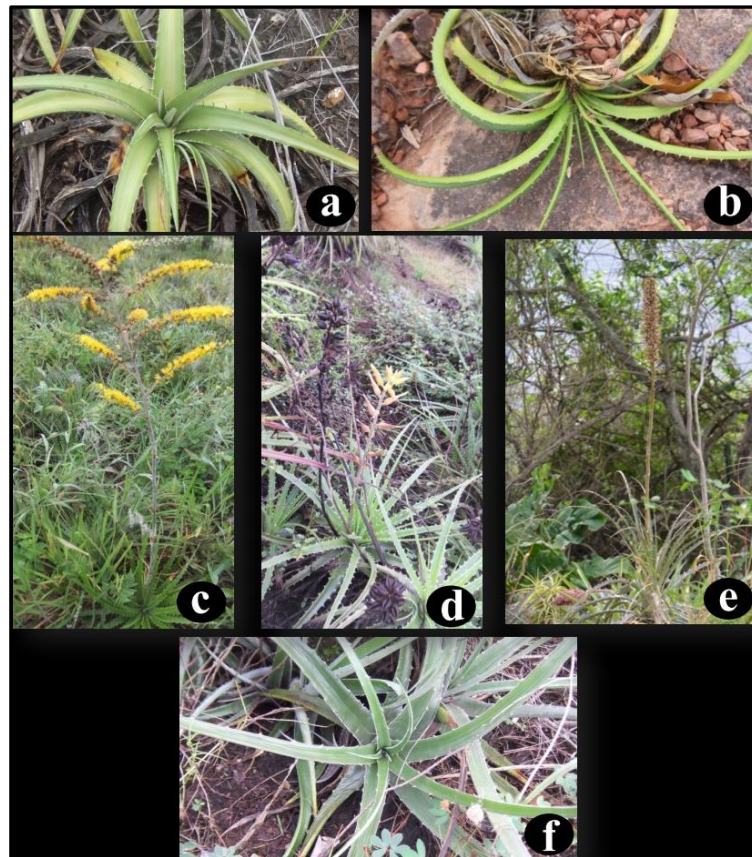
*Dyckia divaricata* Leme & H. Büneker é uma espécie nova encontrada durante as coletas para este trabalho na cidade de Antônio João em Mato Grosso do Sul (Figura 2). É uma planta rupícola, apresentando cerca de 170 cm de altura (com inflorescência). Sua propagação ocorre por brotos basais, as folhas apresentam-se em forma de rosetas, coreáceas, suculentas e com espinhos marginais. O pedúnculo é ereto com cerca de 75 cm de comprimento, a inflorescência amplamente paniculada e uma vez ramificada com cerca de 80 cm de comprimento, apresentando flores amarelas e cápsulas subglobosa (Leme e Büneker, 2015).

*Dyckia excelsa* Leme é saxícola com propagação por brotos basais apresentando de 70 a 130 cm de altura, as folhas são arrançadas em rosetas, coriáceas e com margem serreada. A inflorescência varia de 70 a 130 cm e o pedúnculo de 40 a 100 cm, sendo as flores laranjas e os frutos em cápsula (Paggi *et al.*, 2015). Ocorre nas cidades de Corumbá e Ladário na porção oeste do estado do Mato Grosso do Sul (Paggi *et al.*, 2015). Durante as coletas realizadas neste trabalho também foi encontrada uma população ao sul do Pantanal na cidade de Bodoquena (MS), e há um registro para a cidade de Cuiabá no estado do Mato Grosso (MT) (<http://www.splink.org.br/>) (Figura 2).

*Dyckia exserta* L.B.Sm é planta robusta com cerca de 1 metro de altura (com inflorescência), apresenta folhas com espinhos marginais levemente curvados, escapo robusto e glabro, inflorescência pouco ramificada e glabra e flores subsessíes. Foi descrita e descoberta em Cerro de Corá (Sierra de Amambay) no Paraguai (Smith e Downs, 1974). No presente trabalho amostramos uma população na cidade de Porto Murtinho (MS), região caracterizada por uma vegetação chaquenha (Figura 2).



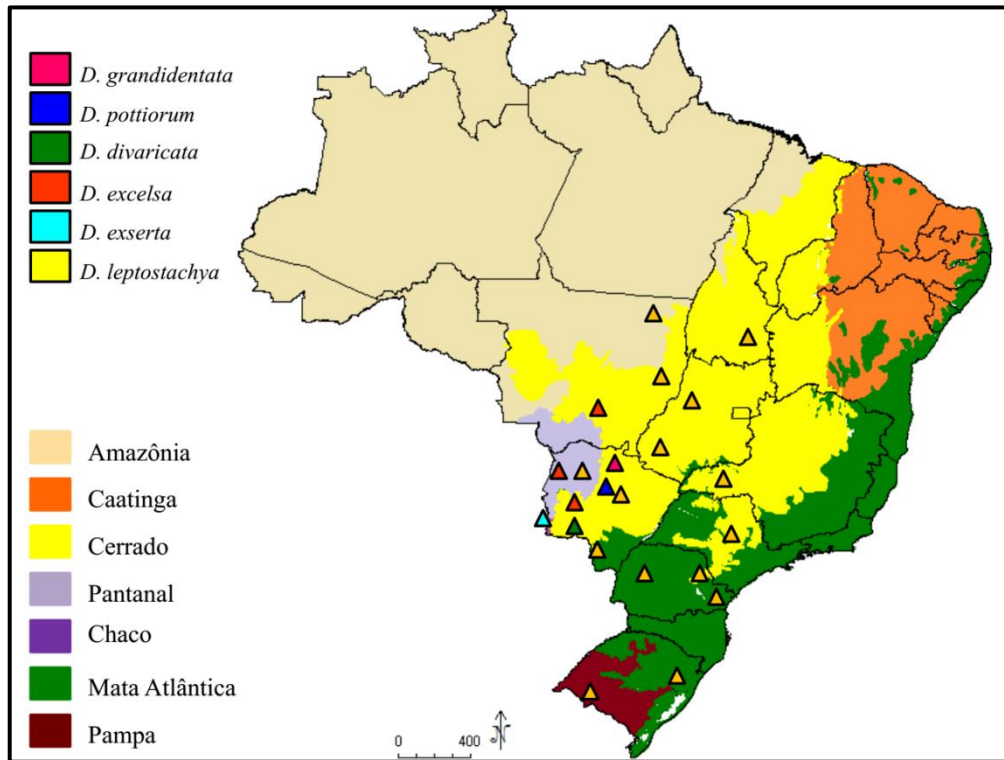
*Dyckia leptostachya* Baker é terrícola, as folhas emergem de um rizoma curto, largo e reto apresenta espinhos marginais castanhos espaçados, inflorescência multifloral simples, poucas vezes ramificada, escapo coberto de levíssima lanugem, cilíndrico e tortuoso, sendo as flores laranja-avermelhadas (Reitz,1983). Possui ampla distribuição, no Brasil ocorre deste o estado do Tocantins (TO) até o Rio Grande do Sul (RS) (<http://www.splink.org.br/>) (Figura 2), além dos países Bolívia, Paraguai e Argentina (Reitz, 1983). Apesar de ser amplamente distribuída, esta espécie também sofre com os impactos ambientais, principalmente no sul do Brasil. No Rio Grande do Sul está na lista da flora ameaçada do estado, na categoria vulnerável (Rio Grande do Sul, 2014), e no estado de Santa Catarina é considerada possivelmente extinta (Consema, 2014).



**Figura 1.** Espécies de *Dyckia*: a) *D. grandidentata*; b) *D. pottiorum*; c) *D. divaricata*; d) *D. excelsa*; e) *D. exserta* e f) *D. leptostachya*  
Registro: Melo, C.A e Zanella, C.M; e) Paggi, G.

Com exceção da espécie de ampla distribuição, *Dyckia leptostachya*, as demais espécies apresentam-se distribuídas quase exclusivamente no estado do Mato Grosso do

Sul. *Dyckia grandidentata*, *D. pottiorum* e *D. divaricata* ocorrem no bioma Cerrado; *D. excelsa* ocorre no Pantanal sul-mato-grossense e no Cerrado; *D. exserta* ocorre na região do Chaco, e *D. leptostachya* ocorre nos biomas Cerrado, Pantanal, Chaco, Mata Atlântica, Pampa, e uma coleta na região amazônica no MT (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição das seis espécies de *Dyckia* nos diferentes biomas brasileiros. Fonte: *Dyckia grandidentata* (Braun e Pereira, 2008), *D. pottiorum* (Leme *et al.*, 2012), *D. divaricata* (Leme e Büneker, 2015), *D. excelsa* (Paggi *et al.*, 2015; <http://www.splink.org.br/>) *D. exserta* (coleta deste trabalho) e *D. leptostachya* (modificado de <http://www.splink.org.br/>); juntamente com informações de coleta realizadas neste trabalho.

### 1.3 Estado do Mato Grosso do Sul: Região Centro-oeste do Brasil que compreende diferentes biomas

O estado do Mato Grosso do Sul (MS) está localizado na região centro-oeste do Brasil e é composto de uma fitogeografia interessante por apresentar ao longo de sua extensão quatro biomas, sendo estes: o Cerrado ocupando a maior parte do estado, seguido do Pantanal a oeste, de uma vegetação chaquenha no sudoeste do Pantanal, e a Mata Atlântica ao sul do estado (Paggi *et al.*, 2015).

O Pantanal está situado no centro da América do Sul, estendendo-se pelo Brasil, Paraguai e Bolívia e apresentando cerca de 160.000 km<sup>2</sup>, sendo que destes, 140.000 Km<sup>2</sup>

estão localizado no Brasil, nos estados do Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS) (Junk *et al.*, 2006). O Pantanal é uma depressão alagável localizada na bacia do Alto Paraguai, compreendendo uma região diversificada e complexa, apresentando desta forma, diferentes “pantanais” conforme a influencia das sub-bacias do rio Paraguai. Em cada uma das sub-bacias ocorrem regimes hídricos distintos, onde o tipo de solo, rocha e estruturas geológicas são diferentes e influenciam na distribuição da flora e fauna, no entanto o ciclo anual de inundação e estiagem compõe o principal processo regulador da dinâmica do meio físico (Guimarães *et al.*, 2014). Apresenta uma vasta biodiversidade sofrendo influência de quatro grandes regiões fitogeográficas, a Mata Decidual, Mata Semidecidual, Cerrado e Chaco (Silva e Caputo, 2010). A depressão do Pantanal é circundada por diferentes formações geológicas que constituem a área de drenagem do Alto rio Paraguai e seus afluentes, como formações de arenitos (Chapada dos Percis, Chapada do Guimarães, Serra de Maracaju e Serra de São Jerônimo), as formações calcárias (Serra das Araras e a Serra da Bodoquena) e os afloramentos graníticos (Serra de São Vicente), já as Morrarias de Urucum e Amolar são caracterizadas como reservas minerais (Junk *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006). A fase de subsidência que deu origem a planície alagável é datada de aproximadamente 2,5 Ma entre o tardio Plioceno e o início do Pleistoceno, fortemente influenciada pela orogênese Andina, e com grandes modificações devido às flutuações climáticas ocorridas no Quaternário (Assine e Soares, 2004; Junk e Cunha, 2005; Souza *et al.*, 2006).

O Chaco está localizado no centro da América do Sul e abrange aproximadamente 840.000Km<sup>2</sup>, estendendo-se pelo norte da Argentina e sudoeste da Bolívia. No Brasil encontra-se apenas ao sul do Pantanal, na região de Porto Murtinho, caracterizando-se como o Chaco úmido. Compreende um alto grau de plantas endêmicas, apresentando uma vegetação tanto arbórea como de savana, incluindo plantas como gramíneas, cactos e bromélias (Pott *et al.*, 2009; Silvia e Caputo, 2010; Werneck, 2011). Sua origem é provavelmente do final do Terciário ou início do Pleistoceno, e assim como o Pantanal, fortemente influenciada pelo soerguimento dos Andes (Werneck, 2011).

O Cerrado é considerado a maior savana do mundo, tanto em relação aos altos níveis de endemismo quanto de espécies adaptadas as suas condições extremas (Novaes *et al.*, 2013). É considerado o segundo maior bioma brasileiro, apresentando em torno de 2 milhões de Km<sup>2</sup>, sendo que esta área já foi reduzida em torno de 50% nos últimos anos,

colocando-o assim como um dos mais importantes *hotspots* de conservação da biodiversidade (Ramos *et al.*, 2009; Novaes *et al.*, 2013). O Cerrado apresenta uma biota heterogênea, variando desde gramíneas até florestas secas, dominado preferencialmente por uma savana arbórea semidecídua, sendo que o fogo neste bioma atua tanto como um fator ecológico quanto uma força evolutiva (Ramos *et al.*, 2009; Pennington *et al.*, 2009). A origem do Cerrado ocorreu provavelmente no período Cretáceo com intensas modificações oriundas das severas condições climáticas ocorridas no Quaternário, tais fatores possivelmente influenciaram na complexa história biogeográfica e no alto nível de biodiversidade desta região (Werneck, 2011). Juntamente com a Caatinga e o Chaco, o Cerrado forma a diagonal seca no centro do Brasil, que constitui um ambiente propício para o desenvolvimento do gênero *Dyckia* (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012; Santos-Silva *et al.*, 2013), e onde o estado do Mato Grosso do Sul está inserido.

#### 1.4 Espécies restritas vs amplamente distribuídas e os estudos filogeográficos

As espécies de distribuição restrita e seus congêneres de ampla distribuição têm sido motivo de muitos estudos ao longo dos anos (Gitzendanner e Soltis, 2000; Lavergne *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2008; Ravikanth *et al.*, 2010). Espera-se, normalmente, que as espécies de distribuição restrita, dado o isolamento geográfico e pelo seu reduzido tamanho populacional sofram abruptamente os efeitos das forças evolutivas, como endogamia, gargalo de garrafa e deriva genética, resultando em baixa diversidade genética. Alguns exemplos descritos na literatura corroboram esse padrão. Gibson *et al.* (2008) estudaram duas espécies do gênero *Alnus* Mill. (Betulaceae). *Alnus maritima* (Marsh) Muhl. ex Nutt, espécie de distribuição restrita, apresentou baixos níveis de diversidade genética e altos níveis de endogamia em comparação com sua congênere de ampla distribuição *Alnus serrulata* (Aiton) Willd.. Níveis de baixa diversidade genética também foram apresentados por palmeiras de distribuição restrita e endêmicas em comparação com espécies de ampla distribuição e não endêmicas (Ravikanth *et al.*, 2010). Lavergne *et al.* (2004), estudaram plantas ocorrentes na região da Mediterrânea Francesa, comparando características ecológicas e traços biológicos em 20 pares congêneres de espécies de plantas (de distribuição restrita e endêmicas vs de ampla distribuição). Os resultados indicaram que as espécies endêmicas diferiram significativamente das espécies de ampla distribuição em vários atributos, como a diferença de habitats, onde as espécies endêmicas preferiram

ambientes pedregosos de vegetação aberta, assim como a baixa produção de pólen e sementes em relação aos seus congêneres de ampla distribuição, entre outras diferenças. Entretanto, outros trabalhos mostram que espécies de distribuição restrita podem apresentar alta diversidade genética. *Aechmea winkleri* Reitz, uma bromélia de distribuição muito restrita e endêmica da Mata Atlântica no sul do Brasil, apresentou altos índices de diversidade genética (Goetze *et al.*, 2015), assim como *Petunia secreta* Stehmann & Semir, rara e endêmica do sul do Brasil, apresentou níveis de diversidade genética equivalentes aos seus congêneres de ampla distribuição (Turchetto *et al.*, 2016).

A filogeografia é uma disciplina integrativa e relativamente recente que utiliza métodos de outras disciplinas (genética de populações, biogeografia, filogenética, entre outras), e que aborda o arranjo espacial de linhagens genéticas, principalmente dentro e entre espécies estritamente relacionadas (Avise, 2009). A filogeografia pode fornecer *insights* de processos que envolvem a origem e distribuição da biodiversidade, utilizando marcadores moleculares de origem biparental (nuclear) e uniparental (mitocondrial e plastidial) para compreender a história evolutiva de uma espécie em um âmbito recente ou antigo, respectivamente (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Ainda, a partir de uma abordagem filogeográfica é possível investigar as mudanças climáticas do passado que tiveram efeitos na estrutura genética de populações de plantas e animais, permitindo a realização de inferências sobre a evolução de espécies dentro dos biomas e também podendo indicar estratégias de conservação para espécies ameaçadas (Ramos *et al.*, 2007). Até o presente momento, poucos estudos filogeográficos foram realizados com bromélias, sendo relatados estudos para alguns gêneros, como *Piticairnia*, *Vriesea*, *Aechmea* e *Catopsis* (Palma-Silva *et al.*, 2009; Boisselier-Dubayle *et al.*, 2010; Zanella, 2013; Goetze, 2014; Kartzinel *et al.*, 2015).

### 1.5 Objetivos

O presente estudo tem como objetivo geral compreender os padrões genéticos e históricos de cinco espécies de *Dyckia* de distribuição restrita (*D. grandidentata* Braun, P.J & E, *D. pottiorum* Leme, *D. divaricata* Leme & H. Büneker, *D. excelsa* Leme e *D. exserta* L.B.Sm), endêmicas do centro-oeste do Brasil, em comparação com a congênere de ampla distribuição (*D. leptostachya* Baker), através de uma abordagem filogeográfica.

1.5.1 Objetivos Específicos

- Analisar o nível de diversidade genética dentro e entre as cinco espécies de distribuição restrita em comparação com a espécie de ampla distribuição;
- Examinar a relação genética entre as espécies, com base no compartilhamento de haplótipos, e verificar se há alguma relação com os diferentes biomas;
- Identificar possíveis barreiras geográficas que possam ter originado o padrão de distribuição destas espécies;

## Capítulo II

Phylogeography of five related *Dyckia* (Bromeliaceae) species endemic from Midwest of Brazil in comparison with widespread congener

---

Artigo a ser submetido à Journal of Heredity

**Phylogeography of five related *Dyckia* (Bromeliaceae) species endemic from Midwest of Brazil in comparison with widespread congener**

Camila de Aguiar Melo<sup>1†</sup>, Camila Martini Zanella<sup>1†</sup>; Gecele Matos Paggi<sup>2</sup>; Luiza Domingues Hirsch<sup>1</sup> and Fernanda Bered<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Avenida Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Laboratório de Genética e Biodiversidade, Ciências Biológicas, Campus Pantanal, P.O Box 252, 79304-902, Corumbá, MS, Brazil.

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\* Author for correspondence: ([fernanda.bered@ufrgs.br](mailto:fernanda.bered@ufrgs.br)). Telephone: +55 51 3308- 6742.

Short running title: Phylogeography of *Dyckia* species



ABSTRACT

*Dyckia* genus (Bromeliaceae) belongs to Pticairnioideae subfamily, and is characterized by the absence of a "tank" that accumulates water, enabling these species to inhabit environments with extreme drought conditions, such as "the dry diagonal" in the center of South America. Mato Grosso do Sul state is located in the dry diagonal and comprises four biomes (Cerrado, Pantanal, Chaco and Atlantic Forest), being one interesting area for phylogeographic studies. The aim of this study was to estimate genetic diversity within and among five restricted *Dyckia* species endemic to the Cerrado and the Pantanal/Chaco biomes, comparing with a congener species with wide geographical distribution through a phylogeographic approach, using two plastid markers (*rpl32-trnL* and *rps16-trnK*) and one nuclear (*phyC*). The results from cpDNA showed that restricted distributed species had low genetic diversity in comparison with the widely distributed species, however the diversity presented by the widely distributed species was not considered high. The nuDNA revealed high genetic diversity and a slightly structured network, indicating that pollen dispersal has been more effective than seeds. The cpDNA genetic relationship showed by haplotype network revealed three haplogroups, one formed by widespread species, other by species that occur in Cerrado and another by Pantanal/Chaco species, indicating that the biogeographic history of these biomes may have influenced the speciation process of this group of species.

Keywords: Bromeliaceae, phylogeography, genetic diversity, cpDNA, nuDNA, Cerrado, Pantanal, Chaco, restricted distribution.

## INTRODUCTION

The Brazilian region comprising the Mato Grosso do Sul federative state (from 17°S to 24°S and 51°W to 58°W), Midwest of Brazil, is an extremely interesting area that harbors four biomes: Pantanal, Cerrado, Chaco and Atlantic Forest. Pantanal is one of the main wetlands in the world, it is located in the Alto Paraguay depression in Central South America, of which 140,000 Km<sup>2</sup> belong to Brazil in Mato Grosso (MT) and Mato Grosso do Sul (MS) Brazilian states (Junk *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2014). This biome is influenced by four phytogeographic regions (Deciduous and Semideciduous forests, Cerrado and Chaco), and is a set of distinct, diverse and complex landscapes mainly in sub-basis of Paraguay River, where soils, rocks and geological structure differ each other, influencing the distribution of flora and fauna (Silva & Caputo, 2010; Guimarães *et al.*, 2014). The biome Chaco, in Brazil, is restricted to southwest of Pantanal, mainly in Porto Murtinho city, in MS Brazilian state, and is characterized by humid Chaco ecoregion (Pott *et al.*, 2009; Silva & Caputo, 2010). Cerrado is described as an ancient biome and covers 2 million Km<sup>2</sup>, being considered the most diverse savanna in the world. It harbors high levels of endemism and species adapted to extreme conditions, but 50% of its original area was reduced in the last years, making this biome one important hotspot for biodiversity conservation (Ramos *et al.*, 2009; Novaes *et al.*, 2013). Together, Caatinga, Cerrado and Chaco biomes constitute the dry diagonal region, which presents favorable conditions for *Dyckia* genera inhabit (Turchetto-Zolet *et al.*, 2012; Santos-Silva *et al.*, 2013) and where the MS state is located.

In this way, MS represents an interesting area to carry out phylogeographical studies on plant and animal species. Phylogeographic studies may be used to explain the spatial organization of genetic lineages, mainly within and among closely related species,

reconstructing the evolutionary relationships among them (Excoffier, 2004; Avise, 2009). In other words, phylogeography can provide insights about the processes involved in the origin and distribution of biodiversity (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013).

Bromeliaceae is one of the most diverse Neotropical family that suffered an extensive adaptive radiation, which comprises 58 genera and more than 3140 species distributed along the tropical and subtropical Americas (from south of United States of America to Patagonia) (Benzing, 2000; Givnish *et al.*, 2014). Currently, the Bromeliaceae family is divided in eight subfamily (Brocchinioideae, (Lindmanioideae, (Tillandsioideae, (Hechtioideae, (Navioideae, (Pitcairnioideae, (Puyoideae, Bromelioideae)))))) (Givnish *et al.*, 2007; 2011); the same authors suggested that bromeliads emerged roughly ca. 100 Mya (Million years ago) with the current subfamilies diverging from each other around 19 Mya.

*Dyckia* genus belongs to Pitcairnioideae subfamily and comprises around 160 terrestrial or saxicolous species, with strong aculeate leaves and tankless. Species of *Dyckia* prefer xeromorphic environments characterized by poor soil, little water supply and high sunlight exposure, such as rocky outcrops and inselbergs (Santos-Silva *et al.*, 2013; Krapp *et al.*, 2014). These species are spread from Bolivia, Brazil, Paraguay, north Argentina to Uruguay, and 83% of known species occurs in Brazil (Leme *et al.*, 2012). The phylogenetic relationship within Pitcairnioideae subfamily indicates one xeric clade formed by *Dyckia*, *Encholirium* and *Deuterocohnia* (Santos-Silva *et al.*, 2013). The ancestor of *Dyckia* and *Encholirium* separated from *Deuterocohnia* around 8.5 and 5.6 Mya in the Bolivian Andes and migrated to central of Brazil when started to diversify around 5.6 and 4.6 Mya; and most of the extant *Dyckia* lineages arose around 2.5 Mya, which was characterized as a secondary radiation after southward expansion (Krapp *et al.*, 2014).

Some *Dyckia* species with narrow geographical distribution are endemics of MS. The narrow endemic species present restricted geographical distribution, fact that enhances the occurrence of some evolutionary forces as genetic drift, inbreeding and bottleneck, which consequently can lead to low genetic diversity (Gibson *et al.*, 2008; Ravikanth *et al.*, 2010). However, recent studies have showed that despite its narrow distribution, some species have high genetic diversity (Goetze *et al.*, 2015; Turchetto *et al.*, 2016). In a comparative study of narrow plant species and its widespread congeners, Lavergne *et al.* (2004) highlighted some differences in habitat, biological and ecology traits between species, such as occupation in rocky habitats with lower competitors and small investment in pollen transfer and seed production by narrow species, are important factors involved in the differentiation encountered between restricted and widespread species from Mediterranean region.

In this context, the present study aims to depict the phylogeographic patterns of five narrow endemics *Dyckia* species from Pantanal/Chaco and Cerrado biomes, in the West-Central Brazilian region, in comparison with one wide distributed congener. Specifically, we used combined nuclear and plastid DNA data to address the following questions: (1) what are the levels of genetic diversity within and among the five narrow *Dyckia* species when compared to a wide ranged related species? (2) What is the genetic relationship among species, based on haplotypes sharing, and how can it be related to the different biomes? (3) Is it possible to identify putative geographical barriers related to the distribution patterns encountered?

## MATERIALS AND METHODS

### STUDIED SPECIES, DISTRIBUTION RANGE AND POPULATIONS SAMPLING

During the years 2014 and 2015, we sampled thirteen populations of five related *Dyckia* species (*D. grandidentata* Braun, P.J & E, *D. pottiroum* Leme, *D. divaricata* Leme & H. Büneker, *D. excelsa* Leme and *D. exserta* L.B.Sm), endemic of Cerrado and Pantanal/Chaco Biomes, and nine populations of the wide distributed species, *Dyckia leptostachya* Baker, totalizing twenty two populations and a total of 143 individuals analyzed for cpDNA (plastid DNA) and 150 for nuDNA (nuclear DNA) (Table 1; Figure 1). All species, except *Dyckia leptostachya*, have restricted distribution range, occurring mostly exclusively in MS state, which comprises the Cerrado (Savannas), Pantanal Wetland (including part of humid Chaco in its southwestern portion) and Atlantic Forest biomes (Paggi *et al.*, 2015). Details on the occurrence of the species and its respective biome, geographical coordinates, as well as abbreviations used hereinafter can be seen in Table 1.

#### DNA EXTRACTION, AMPLIFICATION AND SEQUENCING

Total genomic DNA was extracted from young leaves stored in silica gel using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol, according to Doyle & Doyle (1990). Four cpDNA regions (*rpl32-trnL*, *rps16-trnK*, *ndhF-rpl32* and *trnD-trnT*) were initially tested using representative samples from each species. Two regions were chosen based on polymorphism extent, *rpl32-trnL* and *rps16-trnK* (Shaw *et al.*, 2007), which were amplified and sequenced for 143 individuals from all populations sampled (Table 2). In addition, one nuclear gene, phytochrome C (*phyC*; Louzada *et al.*, 2014), was amplified and sequenced for 150 individuals from all populations sampled (Table 2). All PCR reactions were carried out in a total volume of 20 µl containing 10 ng DNA template, 1 x *Taq* buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP mix, 5 µmol forward and reverse primers and 1U *Taq*

DNA polymerase (Invitrogen) and run using the following parameters: an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 54°C (*rpl32-trnL*), 58°C (*rps16-trnK*) or 64°C (*phyC*) for 1 min, and 72°C for 1 min, and a final extension for 10 min at 72°C. PCR amplifications were performed in a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) and the products sequenced from both ends using a BigDye Kit (Applied Biosystems) by Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

### DATA ANALYSES

The quality of sequences was checked in Chromas Lite version 2.1.1 (<http://technelysium.com.au/>), aligned to obtain consensus in MUSCLE (Edgar, 2004) implemented in MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) and were manually edited. The cpDNA sequences with long indels (more than 4 base pairs-bp) and that presented microinversions of 6 bp, were coded as one evolutionary event (one character). Polymorphisms at mononucleotide microsatellites were excluded due to ambiguous alignment and higher mutation rates. For statistical analyses, the two cpDNA, *rpl32-trnL* and *rps16-trnK*, were concatenated. Haplotypes nuDNA with heterozygous nucleotide positions were resolved by using PHASE version 2.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003), a Bayesian algorithm implemented in DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009). The analysis was run with the default values for 10 000 iterations. Twelve hypervariable sites were excluded from the final nuDNA due to bias of results, most of them related to heterozygotes sites. All analyses were performed separately for cpDNA and nuDNA.

Haplotype (*h*) and nucleotide ( $\pi$ ) diversity (Nei, 1987) were estimated for each population, species and total using the ARLEQUIN 3.1 software (Excoffier *et al.*, 2005). Genealogical relationships among haplotypes for both genomes were inferred using

median-joining method (Bandelt *et al.*, 1999), implemented in the NETWORK 5.0 software (<http://www.fluxus-engineering.com>). Estimates of differentiation ( $G_{ST}$ ,  $N_{ST}$  and  $F_{ST}$  statistics) were calculated in the software DNASP, taking into account the pairwise distance. We performed analyses of molecular of variance (AMOVA) to examine the partition of genetic diversity within and among populations in ARLEQUIN software, in which populations were grouped by species and different biomes.

BAPS version 6.0 (Cheng *et al.*, 2013) was performed for both data set (cpDNA and nuDNA). Analyzes of population genetic structure was employed by clustering sampled individuals into groups. We carried out a genetic mixture analysis to determine the most probable number of groups ( $K$ ) given the data (Corander & Tang, 2007; Corander *et al.*, 2008). The clustering with linked loci analysis was chosen to account for the linkage present between sites within aligned sequences. The admixture analysis was then applied to estimate individual admixture proportions with regards to the most likely number of  $K$  clusters identified (Corander & Marttinen, 2006; Corander *et al.*, 2008). Admixture inference was based on 100 iterations using different allele frequencies.

The population expansion hypothesis was tested for both genomes (cpDNA and nuDNA). Neutrality tests were performed using Tajima's  $D$  (Tajima, 1989), considering the segregating sites and Fu's  $F_s$  (Fu, 1997), based on the haplotype distribution. Tests were carried out with 10 000 simulation steps using ARLEQUIN, considering six groups (different species).

## RESULTS

### GENETIC DIVERSITY

The regions of cpDNA were concatenated and resulted in 1714 bp (*rpl32-trnL* - 901bp and *rps16-trnK* - 813bp), and after the alignment totalized 1672 bp with 22 polymorphic sites, ten transitions, eleven transversions and two indels. The nucleotide composition of cpDNA exhibited 70.9% of AT and 29.11% of CG. The haplotype diversity ( $h$ ) for all populations totalized 0.8563 and nucleotide diversity ( $\pi$ ) was 0.002919 (Table 2). For nuDNA all individuals had their genotypes resolved after PHASE analysis, totaling 150 individuals and 300 alleles copies with 1081 bp. Twelve hypervariable sites were removed from the alignment, totalizing 1069 bp analyzed. Thirty three polymorphic sites, 22 transitions and 12 transversions were observed. The nucleotide composition of nuDNA exhibited 50.38% of AT and 49.63% of CG. The haplotype diversity ( $h$ ) for all populations was 0.7735 and nucleotide diversity ( $\pi$ ) 0.002375 (Table 2).

Considering the genetic diversity indexes for restricted range species, cpDNA haplotype diversity ( $h$ ) varied from 0.0000 in DIV and EXS to 0.7355 in EXC, and the nucleotide diversity ( $\pi$ ) ranged from 0.00000 (DIV and EXS) to 0.000988 (EXC). The genetic diversity indexes for the wide range species showed 0.6259 ( $h$ ) and 0.000735 ( $\pi$ ; Table 2). The results from nuDNA for the restricted species ranged from 0.0000 ( $h$ ) and 0.000000 ( $\pi$ ) in EXS to 0.8563 ( $h$ ) and 0.002943 ( $\pi$ ) in EXC. The wide range species (LEP) showed haplotype diversity of 0.4673 and nucleotide diversity of 0.001166 (Table 2).

#### HAPLOTYPE RELATIONSHIP

Fourteen haplotypes were detected using cpDNA markers. The number of haplotypes in restricted range species varied from one (DIV and EXS) to four in EXC, while the wide distribution species (LEP) showed six haplotypes (Table 2). Considering



all populations of restricted species (GRA, POT, DIV, EXC and EXS) eight haplotypes were observed (H1, H2, H3, H10, H11, H12, H13 and H14) in comparison with the widespread species (LEP) which showed six haplotypes along its distribution (H4, H5, H6, H7, H8 and H9) (Figure 2B).

The phylogenetic relationship indicated low haplotype sharing between species, since almost all presented exclusive haplotypes (Figure 2A and 2B). Concerning restricted species, the haplotype network revealed three haplogroups, one containing populations sampled in Cerrado biome (GRA, POT and DIV), sharing only H1 and H3 haplotypes (Figure 2A and 2B). The other haplogroup included the widespread LEP and do not shared cpDNA haplotypes with other species (Figure 2A), being H5 observed along all its distribution (Figure 2B). The last haplogroup is composed by populations sampled in Corumbá (Pantanal), Porto Murtinho (southwest of Pantanal-Chaco vegetation) and Bodoquena (South Pantanal- Cerrado vegetation) (Figure 2B), where EXC and EXS species occur, without haplotype sharing between them (Figure 2A). The Cerrado haplogroup was separated by three mutational steps from LEP and nine from Pantanal/Chaco haplogroup (Figure 2A).

For nuDNA 46 haplotypes were detected for all the species. The number of haplotypes ranged from one (EXS) to 12 (EXC) in the restricted species, while in the wide distributed species (LEP), 19 haplotypes were observed (Figure 3A). Considering the total populations of restricted species, 27 haplotypes were exclusively observed in comparison with 18 exclusively haplotypes of widespread species (Figure 3B). The most frequent haplotype was Hn1, occurring in populations from GRA, POT, LEP and in one individual of EXC species; moreover this haplotype occurred along all species' distribution range (Figure 3B). Considering network, LEP is more related to GRA and POT than DIV, while

EXC and EXS populations were separated from two mutational steps. This structure showed a slightly differentiation between biomes, with exception of EXC and EXS populations that occurred in Pantanal/Chaco (Figure 3A).

### PHYLOGEOGRAPHIC STRUCTURE

The level of cpDNA differentiation among the analyzed populations was high ( $F_{ST} = 0.964$ ;  $G_{ST} = 0.895$ ;  $N_{ST} = 0.964$ ), and since  $N_{ST} > G_{ST}$  the phylogeographic structure was supported (Vieira *et al.*, 2015). Narrow distributed species showed strong structure, as well as the widespread *D. leptostachya*, although the latter has presented slightly lower structure (Table 3). AMOVA results revealed that 96.59% of the variation was observed among populations. When the populations were grouped into species or biomes, most of the variation was observed among species or biomes (80.27% and 82.28%, respectively; Table 4). BAPS results portioned the samples into seven groups; GRA, POT and EXC was divided in two clusters and DIV and EXS in one, already LEP was divided in three clusters (Figure 4A). The neutrality tests revealed non-significant positive values in GRA, POT and EXC species, and LEP showed negative non-significant values. DIV and EXS species could not be tested because they were monomorphic (Table 5).

The level of differentiation among the analyzed populations using nuDNA was high, but lower than cpDNA ( $F_{ST} = 0.709$ ;  $G_{ST} = 0.456$ ;  $N_{ST} = 0.710$ ) and  $N_{ST}$  also showed higher value than  $G_{ST}$ . The narrow distributed GRA, DIV and EXC species showed high structure values, however POT showed lower structure; the widespread species (LEP) presented moderate structure (Table 3). AMOVA analyses revealed that 71.75% of variation was observed among populations. When populations were grouped into species or biomes, most of the variation occurred among species (44.96%) and among populations

within biome (47.03%), respectively (Table 4). BAPS results revealed six clusters, however not all groups correspond to the species, and only three individuals showed intermediate molecular profile, probably related to retention of ancestral polymorphism by lineage sorting (Figure 4B). The neutrality tests revealed significant negative values for GRA, POT and LEP species, indicating expansion of this species. EXS species could not be tested because had just one population sampled (Table 5).

## DISCUSSION

### GENETIC DIVERSITY WITHIN AND AMONG SPECIES

Geographical distribution is one important factor involved in genetic diversity of plant populations and frequently species with restricted distribution have lower genetic diversity comparing to widespread related congeners (Gibson *et al.*, 2008). However, many studies have been contradicting this paradigm, revealing moderate (Gitzendanner & Soltis, 2000) to high genetic diversity in restricted range species, as observed in a narrow endemic *Petunia* species (Turchetto *et al.*, 2016) and in *Aechmea winkleri* bromeliad (Goetze *et al.*, 2015). Concerning our cpDNA results, we observed that populations from the five restricted range species (GRA, POT, DIV, EXC and EXS) did not show genetic variation ( $h$  and  $\pi$ ; Table 2). On the other hand, we observed that some populations of the widespread *D. leptostachya* species showed variability (LEP02, LEP04, LEP08 and LEP09), specially LEP09, that presented four haplotypes (Table 2). Therefore, in general, in the present study, the pattern in restricted species is in agreement with known idea that endemic and restricted species tend to have lower genetic diversity than widespread congeners (Gibson *et al.*, 2008; Ravikanth *et al.*, 2010). Nattier *et al.* (2012) suggested that species with wide distribution are older than those of restricted distribution, being the

microendemisms one transition step. We studied here the widespread distribution species *D. leptostachya*, which presented more genetic diversity and haplotype sharing than restricted species and may be originated from the first radiation of *Dyckia* lineages (eastern to south Brazil; Krapp *et al.*, 2014).

*Dyckia excelsa* showed the highest values of haplotype and nucleotide diversities for cpDNA, followed by *D. leptostachya* (Table 2). On the other hand, *D. divaricata* was monomorphic, presenting only one haplotype (H3). The lower haplotype sharing (H1 and H3 shared by restricted species and H5 shared along all distribution of widespread species) could be associated with retention of ancestral polymorphism, since we found high structure and lower genetic diversity between populations, and flow are probably inherited due to long distances between them. To date, few studies with phylogeographic approach were performed in Bromeliaceae species (e.g. Palma-Silva *et al.*, 2009; Boisselier-Dubayle *et al.*, 2010; Zanella, 2013; Kartzinel *et al.*, 2015; Goetze *et al.*, 2016) and the haplotype number and diversity have been variable. Many factors may be involved in the levels of intra and inter populational genetic diversity, such as reproductive system, effective number of individuals and founder effect (Frankham *et al.*, 2002). Narrow endemic species, in general, are more vulnerable to drift and have limited gene flow, reducing intra-population genetic variability (Lovelles & Harmick, 1984; Gibson *et al.*, 2008). *Dyckia* species normally show low intra-population variability, since many species are rare and narrow endemics (Krapp *et al.*, 2014). *Dyckia* genus usually has seed dispersal mediated by wind, not achieving long distances (Pereira *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009) and decreasing gene flow among populations. Intra-population genetic diversity also tends to be low in consequence of biparental inbreeding (Schemeske & Lande, 1985). Lavergne *et al.* (2004), pointed out that inhospitable habitat can influence significantly narrow endemic

plants, concerning genetic variability and investment in pollen transfer and seed production, for example. *Dyckia* species are characterized by occur in xeromorphic and inhospitable habitat (Santos-Silva *et al.*, 2013), as well as present restricted seed dispersion (Duarte *et al.*, 2009) and low gene flow (our data). However, *Dyckia* species usually present vegetative propagation (clonal reproduction), which can preserve genotypes in the populations (Izquierdo & Piñero, 2000; Goetze *et al.*, 2015).

The nuDNA results showed higher level of genetic diversity with a total of 46 haplotypes observed (Table 2 and Figure 3A). Most of the populations were polymorphic; with the exception of four *D. leptostachya* and only one *D. exserta* population (Table 2 and Figure 3B). As observed in cpDNA, *D. excelsa* showed the highest values of haplotype and nucleotide diversities, followed by *D. leptostachya* (Table 2). The high genetic diversity showed by *D. excelsa* according to both markers results probably is related to self-incompatibility presented by this species (Paggi GM, personal observation). The high number of haplotypes observed and nuDNA diversity can be consequence of nuclear DNA recombination, high gene flow via pollen, retention of ancestral polymorphism (Avisé, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009; Pennington & Levin, 2015) or a combination of all these factors. Despite the large number of haplotypes, we observed that only Hn1, Hn5 and Hn36 were present in more than one species (Figure 3A and 3B), highlighting low haplotype sharing among them, as observed in cpDNA (Figure 2A and 2B). This low haplotype sharing probably occur as a consequence of the retention of ancestral polymorphism, since we observed low gene flow among populations and species, with low probability of occurrence of recent hybridization events (Figure 4B). Recent divergent lineages may share polymorphism for a certain time (incomplete lineage sorting), as

observed in *Dyckia* genus (Krapp *et al.*, 2014), while some parts of the genome are already differentiated (Nosil *et al.*, 2009).

#### PHYLOGEOGRAPHIC STRUCTURE AND RELATION WITH BIOMES

The narrow species were distributed in two major haplogroups in the cpDNA network, in agreement with biomes where each species occurs (Figure 2A). The nuDNA network, despite lower structure, also revealed slightly differentiation in relation to biomes, mainly considering Pantanal/Chaco (Figure 3A). Therefore, the patterns observed in the networks demonstrated that historical and environmental conditions (e.g. edaphic conditions, temperature, soil fertility) between biomes may be influencing the differentiation in these haplogroups through time. In a recent study, Pennington & Levin (2015) pointed out that ecology of different biomes is an important factor in evolutionary process in a context of phylogenetic and biogeographical patterns. Moreover, Turchetto-Zolet *et al.* (2012), studying two varieties of *Schizolobium parahyba*, also reported biogeographic differences between biomes, demonstrating high structure and separation between Amazon and Atlantic Forest populations. The group of species studied here may had suffered impacts of past periods, mainly in the Pleistocene when most species extant (Krapp *et al.*, 2014). Also, the shifts experienced by these biomes (Cerrado vs Pantanal/Chaco) in Tertiary and Quaternary times (Werneck, 2011), probably influenced the speciation process of these species, as well as the differentiation between haplogroups.

AMOVA cpDNA results (Table 4), as well as genetic differentiation indexes (Table 3), showed high values among groups (species and biomes), which are in agreement with the structure observed in the networks. Vieira *et al.* (2015) analyzed plastid DNA of *Ficus bonijesulapensis* and found a phylogeographic structure in agreement with floristic units of

SDTF (Seasonally Dry Tropical Forest), where this species occurs. The high plastidial structure encountered here indicates that most lineages were not able to migrate to other areas by long-distance dispersal (Krapp *et al.*, 2014). Assuming a maternal inheritance of plastids in *Dyckia*, as observed in *Fosterella* genus (Wagner *et al.*, 2015), a strong geographic pattern of plastid haplotypes would implicate weak seed dispersal abilities (Krapp *et al.*, 2014).

Considering nuDNA results, we observed similar patterns to cpDNA, but with a lower genetic structure. Nuclear DNA showed higher genetic diversity and haplotype number than cpDNA, and the haplotypes were more related (Figure 3A). We also observed more haplotype sharing, especially Hn1 (Figure 3A and 3B). AMOVA results also corroborates with slightly differentiation between biomes on network, with low structuring among them (Table 4). Goetze (2014), studying seven bromeliads species, also reported that nuDNA revealed less structure than cpDNA results, and the haplotypes were separated by one or a few mutational steps, with an extensive sharing.

We observed a pronounced genetic structure of cpDNA and nuDNA, being nuDNA slightly less structured (Table 3). Similar pattern was observed in other bromeliads species (*Alcantarea* – Barbará *et al.*, 2008; *Vriesea* – Palma-Silva *et al.*, 2009; Paggi *et al.*, 2010; *Zanella et al.*, 2016; *Pitcairnia* – Palma-Silva *et al.*, 2011 and *Aechmea* – Goetze, 2014), which may be the result of better efficiency of gene flow through pollen when comparing with gene flow via seeds. In the reproductive biology study of *Dyckia brevifolia*, Rogalski *et al.* (2009) observed bees, hummingbirds and butterflies as floral visitors, being the *Amazilia versicolor* hummingbird the main pollinator. On the other hand, in *D. tuberosa* only hummingbirds (*Chlorostilbon aureoventris*, *Colibri serrirostris* and *Phaethornis eurynome*) visited the flowers (Vosgueritchian & Buzato, 2006). Moreover, according to

Krapp *et al.* (2014), *Dyckia* species are characterized as having capsule fruit that release winged anemochorous seeds upon dehiscence, being the seeds dispersal probably less efficient than pollen.

*Dyckia* populations/species of narrow distribution studied here probably remained stable during their evolutionary history, including the last glacial maximum period, since the cpDNA neutrality tests presented non-significant positive or negative values (Table 5). However, the neutrality test performed using nuDNA data showed significant negative values in two narrow species (GRA, POT) and in the widespread species (LEP), indicating expansion of these populations (Carvalho, 2011). Interestingly, these species occur in Cerrado domain, whose geomorphology is characterized by younger and older geomorphic surfaces arranged in a landscape dominated by vast plateaus (Werneck, 2011). During the Late Pleistocene, lower plateaus were much drier than today and dominated by more xeric-adapted vegetation, but amelioration of the climate allowed the Cerrado to expand (Prado & Gibbs, 1993; Werneck, 2011), which is in agreement with our nuDNA results.

#### HISTORICAL EVENTS AND GEOGRAPHICAL BARRIERS

The cpDNA results pointed out restricted gene flow between different biomes (Cerrado vs Pantanal/Chaco), which is interesting in the light of the biogeographical history of these regions and may have influenced the speciation process of *Dyckia* species studied here. Past periods of climatic fluctuations (glacial/interglacial) altered dramatically South America in context of landscape and evolution (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013), promoting shifts in biodiversity and potentially promoted geographical barriers that can be involved in speciation of these *Dyckia* species.



Cerrado biome was formed during Cretaceous, with dynamics fluctuations in Quaternary period, when range expansion and contraction suggested changes in vegetation (Werneck, 2011). On the other hand, Pantanal, situated in Alto Paraguay Depression, was formed during the upper Pliocene to lower Pleistocene (~2.5 Mya), as a consequence of tectonic reactivation directly influenced by Andes uplift (Assine & Soares, 2004; Junk & Cunha, 2005; Souza *et al.*, 2006; Silva & Caputo, 2010). Pantanal suffered severe climatic changes and tectonic activity during the Quaternary, which led to the formation of different types of vegetation seen today (Assine & Soares, 2004; Junk & Cunha, 2005). Chaco is restricted to southwestern Pantanal in Brazil, and its origin has been also associated to Andes uplift (Pott *et al.*, 2009; Carvalho & Almeida, 2011; Silva & Caputo, 2010). Andes and Brazilian Central Plateau uplift occurred during Tertiary (Carvalho & Almeida, 2011), and together with severe climatic fluctuations in Quaternary probably led to expansion of *Dyckia* ancestor through corridor from Andes toward eastern, in central Brazil (Werneck *et al.* 2012; Krapp *et al.*, 2014). Therefore, *Dyckia* origin occurred in the central Brazil (Cerrado) and after suffered southward expansion. A second radiation event spread the species to other areas, such as Pantanal/Chaco and Caatinga (Krapp *et al.*, 2014).

Pantanal can be considered a depression surrounded by different geological formations. In Brazilian part, it is composed of sandstone from different ages (Chapada dos Percis, Chapada dos Guimarães, Serra de Maracaju and Serra de São Jerônimo), limestones (Serra das Araras and Serra da Bodoquena), and other formations. (Junk *et al.*, 2006). Serra de Maracaju is located in the central region of MS, dividing the state in east and west half and acting as watershed between Paraná River Basin in east and Paraguay River Basin in west (Hannibal & Neves-Godoy, 2015). Our cpDNA results showed three haplogroups, being two of them formed by species that occur in Cerrado domain of Serra

de Maracaju and others landscape elevation (GRA, POT and DIV) in comparison with the other haplogroup formed by species that live in the west part of this sandstone with Pantanal/Chaco vegetation (EXC and EXS). Therefore, Serra de Maracaju and differences in elevation of landscape (Cerrado vs Pantanal/Chaco) is probably one important geographical barrier that led speciation between these species and the high structure between these two haplogroups; being the gene flow hindered and differences in environmental conditions of these biomes providing the accumulation of genetic differences and creating this high structure among species. However, more studies on species that live along Serra de Maracaju and the others elevation in comparison with Pantanal lowland should be performed to confirm this pattern and help to understand the endemism of species studied here.

#### CONCLUDING REMARKS

The present study revealed strong phylogeographic structure among the six studied species, mainly in cpDNA, and showed two haplogroups related with Cerrado or Pantanal/Chaco, where the species occur. The local endemism and lower genetic diversity of GRA, POT, DIV, EXC and EXS indicated the necessity of conservation efforts of these biomes that have been suffering with intensive cattle ranching, agriculture, tourism, and other anthropogenic impacts (Loyola *et al.*, 2014). Despite the wide distribution of LEP its genetic diversity is not high and also point to conservation efforts, mainly in southern Brazil where it is in the list of threatened flora of Rio Grande do Sul state (Rio Grande do Sul, 2014) and considered extinct in Santa Catarina Brazilian State (Consema, 2014).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Walter Kranz for information on *Dyckia* and collection support. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 457698/2014-4 and Ação Transversal nº6/2011 — Casadinho/Procad), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (11/2014 – Universal-MS) and Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS) C.A.M received fellowship from CNPq.

#### REFERENCES

- Assine ML, Soares PC (2004) Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International*, 114: 23-34.
- Avisé JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Barbará T, Lexer C, Martinelli G, Mayo S, Fay MS, Heuertz M (2008) Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity*, 101: 285-296.
- Bandelt H-J, Forster P e Röhl A (1999) Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.
- Benzing DH (2000) Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 690 p.
- Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C (2010) Genetic Structure of the xerophilous bromeliad *Ptticairnia geyskesii* on iselbergs in French Guiana- a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography*, 33: 175-184.
- Carvalho CJB, Almeida EAB (2011) Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos. São Paulo: Roca, 306p.
- Carvalho PH (2011) Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 113p.
- Cheng L, Connor TR, Sirén J, Aanensen DM, Corander J (2013) Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (5): 1224-1228.
- Consema- Conselho Estadual de Meio Ambiente de Santa Catarina (2014). Resolução Consema Nº 51, de 5 de dezembro de 2014. Reconhece a Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de

- Extinção no Estado de Santa Catarina e dá outras providências. Site: <http://www.fatma.sc.gov.br/upload/Flora/resconsema51.pdf> (last access in 17.03.2016).
- Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology*, 15: 2833-2843.
- Corander J, Tang J (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences*, 205 (1): 19-31.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9: 539.
- Doyle JJ e Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Duarte EF, Carneiro IF, Rezende MH (2009) Morfologia de Frutos e Sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae). *Revista de Biologia Neotropical*, 6(1): 1-12.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
- Excoffier L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13: 853-864.
- Excoffier L, Laval LG e Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1:47-50.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, New York, 617p.
- Gibson JP, Rice SA, Stucke CM (2008) Comparison of population genetic diversity between a rare, narrowly distributed species and a common, widespread species of *Alnus* (Betulaceae). *American Journal of Botany*, 95(5): 588-596.
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of botany*, 87 (6): 783-792.
- Givnish TJ, Milliam KC, Berry PE e Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23: 3-26.
- Givnish, TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC *et al* (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872-895.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evan TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ (2014) Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71: 55–78.

- Goetze M (2014) Especiação e Diversidade Genética no subgênero *Ortgiesia* (*Aechmea*, Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 132p.
- Goetze M, Büttow MV, Zanella CM, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro FG, Sampaio JAT, Palma-Silva C, Cidade FW, Bered F (2015) Genetic Variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58: 204-210.
- Goetze M, Palma-Silva C, Zanella CM, Bered F (2016) East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. *Botanical Journal of Linnean Society*, p.n/a-n/a. DOI: 10.1111/boj.12416
- Guimarães E, Trevelin CC, Manoel OS (2014) Pantanal: Paisagens, Flora e Fauna. São Paulo: Cultura Acadêmica, 1.ed. 80p.
- Izquierdo LY, Piñero D (2000) High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Aust J Bot* 48:645-650
- Hannibal W, Neves-Godoi M (2015) Non-volant mammals of the Maracaju Mountains, southwestern Brazil: composition, richness and conservation. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86: 217-225.
- Junk, WJ, Cunha CN (2005) Pantanal: a large South American Wetland at a crossroads. *Ecological Engineering*, 24: 391-401.
- Junk WJ, Cunha CN, Wantzen KM, Petermann P, Strüßmann C, Marques MI, Adis J (2006) Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences*, 68: 278-309.
- Kartzinel TR, Campbell DA, Trapnell DW (2015) Spatial Patterns of Haplotype Variation in the Epiphytic Bromeliad *Catopsis nutans*. *Biotropica*, 0 (0): 1-12.
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, Weising K (2014) Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematics and Evolution*, DOI 10.1007/s00606-014-0985-0.
- Lavergne S, Thompson JD, Garnier E, Debussche M (2004) The biology and Ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *OIKOS*, 107: 505-518.
- Leme EMC, Ribeiro OBC e Miranda ZJG (2012) New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. *Phytotaxa*, 67: 9-37.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Louzada RB, Schulte S, Wanderley MGL, Silvestro D, Zizka G, Barfuss MHJ, Palma-Silva C (2014). Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.03.007>.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst*, 15: 65-95.

- Loyola R, Machado N, Vila Nova D, Martins E, Martinelli G (2014) Áreas Prioritárias para a Conservação e uso Sustentável da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Realização: CNCFlora ( Centro Nacional de Conservação da Flora do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro) and CB-Lab(Laboratório de Biogeografia da Conservação da Universidade Federal de Goiás). Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, 80p.
- Nattier R, Grandcolas P, Elias M, Desutter-Grandcolas L, Jourdan H, Couloux A, Robillard T (2012) Secondary Sympatry caused by range expansion informs on the dynamics of microendemism in a biodiversity hotspot. PLOS ONE, 7:1-9.
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. Molecular Ecology, 18: 375-402.
- Novaes RML, Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2013) Concordance between Phylogeographical and Biogeographical Patterns in the Brazilian Cerrado: Diversification of the Endemic Tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). PLOS One, 8: 1-13.
- Paggi GM, Louzada RB, Ishii IH, Takahasi A, Arruda RCO, Lorenz-Lemke AP (2015) Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: Taxonomy, Geographic Distribution, and Notes of Leaf Anatomy. Systematic Botany, 40 (1), p.129-135.
- Paggi GM, Sampaio JAT, Bruxel M, Zanella CM, Goetze M, Büttow MV, PalmaSilva C, Bered F (2010) Seed dispersal and population structure in *Vriesea gigantea*, a bromeliad from the Brazilian Atlantic Rainforest. Botanical Journal of the Linnean Society, 164: 317-325.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini (2009) Range-Wide Patterns of Nuclear and Chloroplast DNA Diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical Forest Species. Heredity, 103:503-512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. Molecular Ecology, 20: 3185-3201.
- Pennington RT, Levin M (2015) The contrasting nature of woody plant species in different neotropical forest biomes reflects differences in ecological stability. New Phytologist, 210: 25-37.
- Pereira AR, Pereira TS, Rodrigues AS, Andrade ACS (2008) Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. ACTA Botânica Brasileira, 22 (4): 1150-1162.
- Pott A, Pott VJ, Damasceno-Júnior GA (2009) Fitogeografia do Pantanal. III Congresso Latino Americano de Ecologia (IIICLA) e IX Congresso Brasileiro de Ecologia (IXCEB), 10 a 17/setembro, São Lourenço, Minas Gerais, Brasil.

- Prado DE, Gibbs PE (1993) Patterns of species distribution in the dry seasonal Forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80 (4): 902-927.
- Ravikanth G, Nageswara-Rao M, Narwade A, Shaanker RU, Ganeshaiyah KN (2010) Do endemic Rattans Have Lower Genetic Variability than Their Co-generic and Con-specific Non-endemic Rattans? *Gene, Genomes and Genomic*, 4 (Special Issue 1):22-27.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2009) Phylogeographical Structure of the Neotropical Forest Tree *Hymenae courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenae stigonocarpa* from Cerrado. *Journal of Heredity*, 100(2): 206-216.
- RIO GRANDE DO SUL (2014) Decreto 52.109 de 19 de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. Site: <http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20141222103647doe.pdf> (last access in: 17.03.2016).
- Rogalski JM, Reis A, Reis MS, Hmeljevski KV (2009) Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, V.32, n.4, p. 691-702.
- Santos-Silva F, Saraiva DP, Monteiro RF, Pita P, Mantovani A, Forzza RC (2013) Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it?. *Flora*, 208: 508-521.
- Schemeske D, Lande R (1985) The Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression in Plants. 2. Empirical Observations. *Evolution* 39(1): 41-52.
- Silva JSV, Caputo ACB (2010) Localização e distribuição da Vegetação Savana Estépica (Chaco) no Pantanal Brasileiro. *Anais 3º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal, Cáceres, MT. 16 a 20/Outubro. Embrapa Informática Agropecuária/INPE*, p314-323.
- Souza CA, Lani JL, Sousa JB (2006) Origem e Evolução do Pantanal Mato-Grossense. VI Simpósio Nacional de geomorfologia. *Geomorfologia tropical e subtropical: processos, métodos e técnicas. 6 a 10/setembro. Goiânia, Brasil.*
- Shaw J, Lickey EB., Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94: 275-288.
- Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics*, 73: 1162-1169.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68: 978-989.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.

- Turchetto C, Segatto ALA, Mäder G, Rodrigues DM, Bonatto S, Freitas LB (2016) High Levels of Genetic Diversity and Population Structure in an Endemic and rare Species: Implications for Conservation. *AoB Plants*, v. 1p. doi: 10.1093/aobpla/plw002.
- Turchetto-Zolet AC, Cruz F, Vendramin GG, Simon MF, Salgueiro F, Margis-Pinheiro M, Margis R. (2012). Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae) *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65:174-182.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, PalmaSilva, C. (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22, 1193-1213.
- Vieira FA, Novaes RML, Fajardo CG, Santos RM, Almeida HS, Carvalho D, Lovato MB (2015) Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177: 189-201.
- Vosgueritchian SB, Buzato S (2006) Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Ptilacnoideae) e interação planta-animal. *Revista Brasileira de Botânica*, V.29, n.3, p. 433-442.
- Wagner ND, Wöhrmann T, Öder V, Burmeister A, Weising K (2015) Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: A case study in *Fosterella* (Ptilacnoideae). *Plant Systematics and Evolution*, 301: 2231–2246.
- Werneck FP (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30: 1630-1648.
- Werneck FP, Nogueira C, Colli GR, Sites-Jr JW, Costa GC (2012) Climatic stability in the Brazilian Cerrado: Implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography*, 39: 1695-1706.
- Zanella CM (2013) Padrões históricos e processos de hibridação entre duas espécies simpátricas de bromélias da Mata Atlântica: Implicações evolutivas e conservacionistas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 127p.
- Zanella CM, Palma-Silva C, Goetze M, Bered F (2016) Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. *Botanical Journal of Linnean Society*, p 1. DOI: 10.1111/boj.12424



**List of Tables**

**Table 1.** Populations sampled with identification code (ID), distribution of species, geographical coordinates and biomes where species occur.

Species/Population	Distribution	ID	Lat S	Long W	Biome
<i>Dyckia grandidentata</i> (GRA)		Restricted			
São Gabriel do Oeste-MS		GRA01	19°19'	54°48'	Cerrado
São Gabriel do Oeste-MS		GRA02	19°18'	54°48'	Cerrado
Coxim-MS		GRA03	18°32'	54°47'	Cerrado
Coxim-MS		GRA04	18°30'	54°46'	Cerrado
<i>Dyckia pottiorum</i> (POT)		Restricted			
Corguinho-MS		POT01	19°43'	54°54'	Cerrado
Aquidauana-MS		POT02	20°06'	55°07'	Cerrado
<i>Dyckia divaricata</i> (DIV)		Restricted			
Antônio João-MS		DIV01	22°12'	56°00'	Cerrado
Antônio João-MS		DIV02	22°07'	56°05'	Cerrado
<i>Dyckia leptostachya</i> (LEP)		Widespread			
Corumbá-MS		LEP01	19°10'	57°32'	Pantanal
Corumbá-MS		LEP02	19°14'	57°38'	Pantanal
Corumbá-MS		LEP03	19°14'	57°38'	Pantanal
Corumbá-MS		LEP04	19°16'	57°31'	Pantanal
Antônio João-MS		LEP05	22°12'	56°00'	Cerrado
Porto Murtinho-MS		LEP06	21°41'	57°46'	Pantanal/Chaco
Londrina-PR		LEP07	23°38'	51°5'	Atlantic Forest
Porto Alegre-RS		LEP08	30°02'	51°07'	Atlantic Forest

## Filogeografia de espécies de *Dyckia* endêmicas de uma região do centro-oeste brasileiro

---

Porto Alegre-RS	LEP09	30°07'	51°14'	Atlantic Forest
<i>Dyckia exserta</i> (EXS)	Restricted			
Porto Murtinho-MS	EXS	21°27'	57°55'	Pantanal/Chaco
<i>Dyckia excelsa</i> (EXC)	Restricted			
Corumbá-MS	EXC01	19°10'	57°32'	Pantanal
Corumbá-MS	EXC02	19°04'	57°37'	Pantanal
Corumbá-MS	EXC03	19°16'	57°31'	Pantanal
Bodoquena-MS	EXC04	20°47'	56°37'	Pantanal/Cerrado
Total	22			

---

**Table 2.** Diversity indexes for plastid DNA sequences (*rpl32-trnL* + *rps16-trnK*) and nuclear DNA (nuDNA-*phyC*) for *Dyckia* species. Sample size for both genomes (N), haplotype diversity (*h*), nucleotide diversity ( $\pi$ ) and number of haplotypes (*NH*).

Species/Population	cpDNA				NuDNA			
	N	<i>h</i>	$\Pi$	<i>NH</i>	N	<i>H</i>	$\Pi$	<i>NH</i>
<i>Dyckia grandidentata</i> (GRA)								
GRA01	8	0.0000	0.000000	1	8	0.6167	0.000686	6
GRA02	7	0.0000	0.000000	1	8	0.7250	0.000865	4
GRA03	10	0.0000	0.000000	1	11	0.4805	0.000510	3
GRA04	5	0.0000	0.000000	1	5	0.6222	0.000665	3
Total species	30	0.2874	0.000344	2	32	0.7202	0.001070	10
<i>Dyckia pottiorum</i> (POT)								
POT01	11	0.0000	0.000000	1	11	0.1732	0.000162	2
POT02	8	0.0000	0.000000	1	10	0.3632	0.000364	4
Total species	19	0.5146	0.000308	2	21	0.2660	0.000263	5
<i>Dyckia divaricata</i> (DIV)								
DIV01	11	0.0000	0.000000	1	11	0.1732	0.000162	2
DIV02	6	0.0000	0.000000	1	7	0.6593	0.000740	3
Total species	17	0.0000	0.000000	1	18	0.5841	0.000796	4
<i>Dyckia leptostachya</i> (LEP)								
LEP01	6	0.0000	0.000000	1	6	0.6818	0.001120	4
LEP02	4	0.5000	0.000299	2	3	0.8000	0.001497	3
LEP03	7	0.0000	0.000000	1	6	0.3030	0.000283	2
LEP04	5	0.6000	0.000359	2	5	0.9333	0.002640	8
LEP05	1	1.0000	0.000000	1	2	0.0000	0.000000	1
LEP06	4	0.0000	0.000000	1	4	0.9643	0.003374	7
LEP07	8	0.0000	0.000000	1	7	0.0000	0.000000	1
LEP08	7	0.2857	0.000684	2	8	0.0000	0.000000	1

**Filogeografia de espécies de *Dyckia* endêmicas de uma região do centro-oeste brasileiro**

---

LEP09	7	0.8095	0.001026	4	7	0.0000	0.000000	1
Total species	49	0.6259	0.000735	6	48	0.4673	0.001166	19
<i>Dyckia exserta</i> (EXS)								
EXS	4	0.0000	0.000000	1	6	0.0000	0.000000	1
Total specie	4	0.0000	0.000000	1	6	0.0000	0.000000	1
<i>Dyckia excelsa</i> (EXC)								
EXC01	6	0.0000	0.000000	1	7	0.1429	0.000134	2
EXC02	5	0.0000	0.000000	1	4	0.6071	0.000635	3
EXC03	3	0.0000	0.000000	1	3	0.8000	0.001497	3
EXC04	10	0.0000	0.000000	1	11	0.8009	0.002195	8
Total species	24	0.7355	0.000988	4	25	0.8563	0.002943	12
Total populations	143	0.8563	0.002919	14	150	0.7735	0.002375	46

---

**Table 3.** Genetic differentiation of narrow and widespread *Dyckia* species, *D. grandidentata* (GRA), *D. pottiorum* (POT), *D. divaricata* (DIV), *D. exserta* (EXS), *D. excelsa* (EXC), *D. leptostachya* (LEP) and all populations for plastid (cpDNA) and nuclear (nuDNA-*phyC*) markers.

Range distribution	Narrow					Widespread	
Parameters	GRA	POT	DIV	EXS	EXC	LEP	All populations
cpDNA							
$F_{ST}$	1.000 (0.00)	1.000 (0.00)	-	-	1.000 (0.00)	0.600 (0.17)	0.964 (0.01)
$G_{ST}$	1.000 (0.00)	1.000 (0.00)	-	-	1.000 (0.00)	0.578 (0.18)	0.895 (0.03)
$N_{ST}$	1.000 (0.00)	1.000 (0.00)	-	-	1.000 (0.00)	0.600 (0.17)	0.964 (0.01)
$N_{ST} - G_{ST}$	0	0	-	-	0	0.022	0.069
nuDNA							
$F_{ST}$	0.515 (0.23)	0.032 (7.33)	0.649 (0.13)	-	0.605 (0.16)	0.309 (0.56)	0.709 (0.10)
$G_{ST}$	0.168 (1.23)	0.008 (28.74)	0.373 (0.42)	-	0.314 (0.54)	0.248 (0.75)	0.456 (0.30)
$N_{ST}$	0.516 (0.23)	0.032 (7.33)	0.649 (0.13)	-	0.605 (0.16)	0.309 (0.56)	0.710 (0.10)
$N_{ST} - G_{ST}$	0.348	0.024	0.276	-	0.291	0.061	0.254

$F_{ST}$ : genetic differentiation among all populations;  $G_{ST}$  genetic differentiation among all populations;  $N_{ST}$ : differentiation for ordered alleles.

**Table 4.** Analyses of Molecular Variance (AMOVA) based on cpDNA (*rpl32-trnL+rps16-trnK*) and nuDNA (*phyC*).

Source variation	d.f	Sum. of Squares	Variance composition	Variation percentage	Fixation indices*
cpDNA					
Among populations	21	335.968	2.465	96.59	$F_{ST} : 0.965$
Within populations	121	10.521	0.086	3.41	
cpDNA(species groups)					
Among species	5	285.055	2.393	80.27	$F_{CT} : 0.802$
Among populations within species	16	50.913	0.501	16.81	$F_{ST} : 0.970$
Within populations	121	10.521	0.086	2.92	$F_{SC} : 0.852$
cpDNA(biome groups)					
Among biomes	2	269.178	2.895	82.28	$F_{CT} : 0.822$
Among populations within biome	19	66.790	0.536	15.25	$F_{ST} : 0.975$
Within populations	121	10.521	0.086	2.47	$F_{SC} : 0.860$
nuDNA					
Among populations	21	276.208	0.944	71.75	$F_{ST} : 0.717$
Within populations	278	103.359	0.371	28.25	
nuDNA (species groups)					
Among species	5	186.570	0.639	44.96	$F_{CT} : 0.449$
Among populations within species	16	89.637	0.411	28.92	$F_{ST} : 0.738$
Within population	278	103.359	0.371	26.12	$F_{SC} : 0.525$
nuDNA (biome groups)					

**Filogeografia de espécies de *Dyckia* endêmicas de uma região do centro-oeste brasileiro**

---

Among biomes	2	95.882	0.395	27.29	$F_{CT} : 0.272$
Among populations within biome	19	180.326	0.681	47.03	$F_{ST} : 0.743$
Within populations	278	103.359	0.371	25.67	$F_{SC} : 0.646$

---

\*All fixation indices showed  $P < 0.001$

**Table 5.** Summary of demographic expansion tests performed in groups of different species of *Dyckia*, *D. grandidentata* (GRA), *D. pottiroum* (POT), *D. divaricata* (DIV), *D. exserta* (EXS), *D. excelsa* (EXC) and *D. leptostachya* (LEP). Significant values in bold.

Parameter	GRA	POT	DIV	EXS	EXC	LEP
cpDNA						
Tajima's $D$	0.283	1.471	-	-	1.228	-0.223
Fu's (1997) $F_S$	1.930	1.410	-	-	1.494	-0.442
nuDNA						
Tajima's $D$	-0.844	<b>-1.646</b>	0.394	-	1.583	<b>-1.491</b>
Fu's (1997) $F_S$	<b>-4.108</b>	<b>-3.876</b>	0.173	-	-1.457	<b>-14.974</b>

---

## Figure legends

**Figure 1.** Map showing the geographical location of *Dyckia* species collected along MS, PR and RS Brazilian Federative States. The symbols correspond to populations sampled and colors represent different species (see in Table 1 the abbreviations). Different colors on the map represent distinct biomes: Pantanal/Chaco (purple), Atlantic Forest (green) and Cerrado (yellow). Abbreviation on the map indicate Brazilian States: RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; PR: Paraná; SP: São Paulo and MS: Mato Grosso do Sul.

**Figure 2.** (A) Median-joining network showing the genealogical relationship recovered for 14 cpDNA haplotypes; each circle represents one haplotype, its diameter is proportional to its frequency. Network labeled by species sampled, each color representing one of the six species as indicated by the key on the right. Dashed colored lines represent the two haplogroups observed related with biomes: purple: Pantanal/Chaco and yellow: Cerrado (B) haplotype distribution along the sampled geographical distribution. Different colors on the map represent distinct biomes: Pantanal/Chaco (purple), Atlantic Forest (green) and Cerrado (yellow).

**Figure 3.** (A) Median-joining network showing the genealogical relationship recovered for 46 nuDNA haplotypes; each circle represents one haplotype, its diameter is proportional to its frequency. Network labeled by species sampled, each color representing one of the six species as indicated by the key on the right. (B) haplotype distribution along the sampled geographical distribution. Different colors on the map represent distinct biomes: Pantanal/Chaco (purple), Atlantic Forest (green) and Cerrado (yellow).

**Figure 4.** Population genetic structure of six *Dyckia* species inferred with BAPS for A) cpDNA and a K=7 groups model; B) nuDNA and a K=6 groups model.



Figure 1

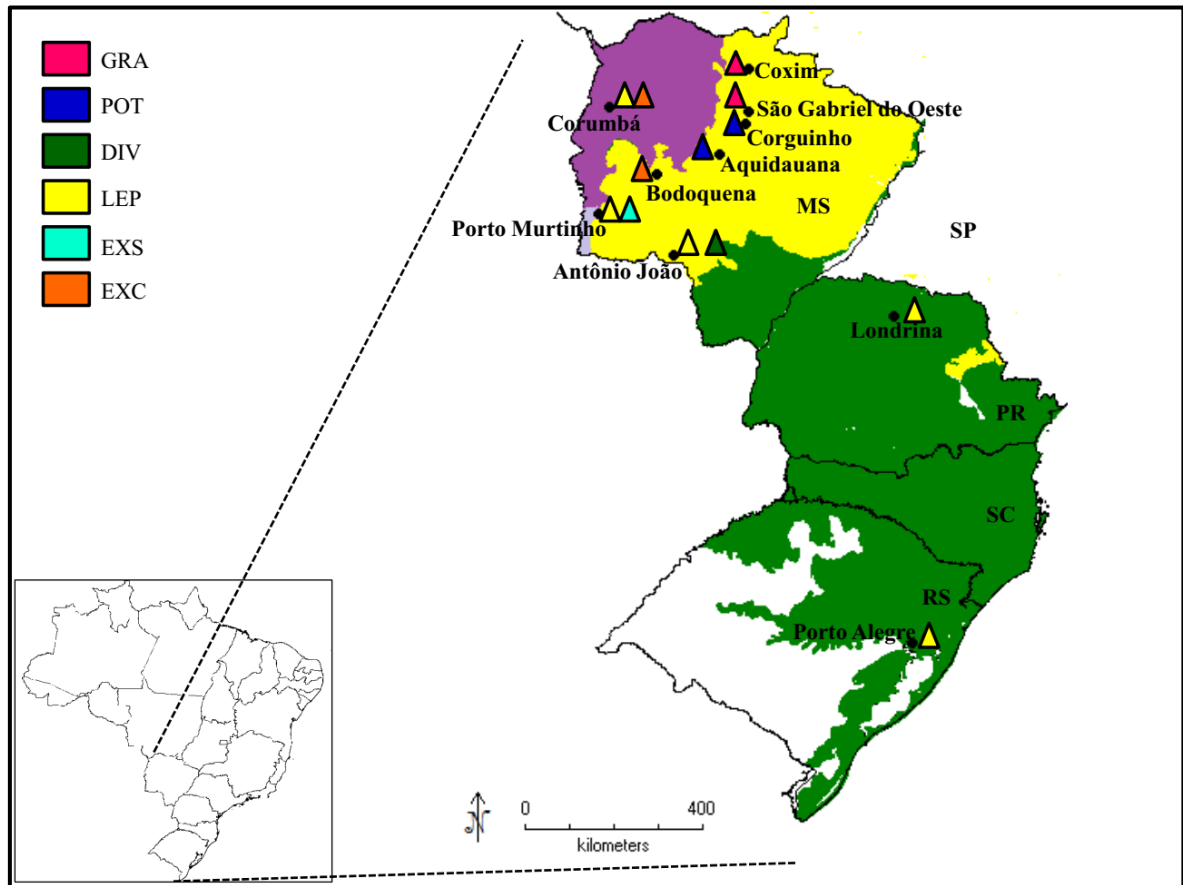




Figure 3

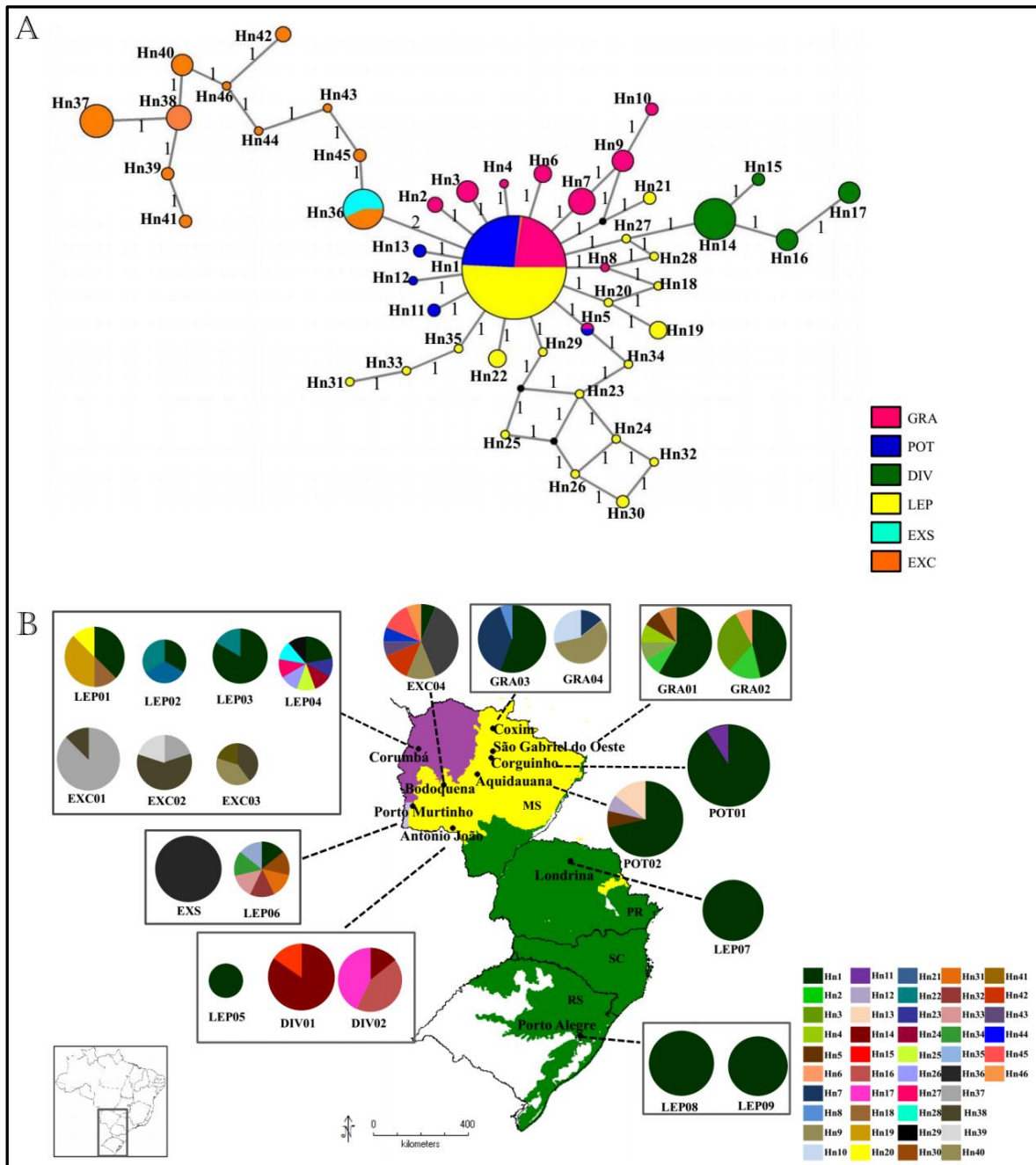
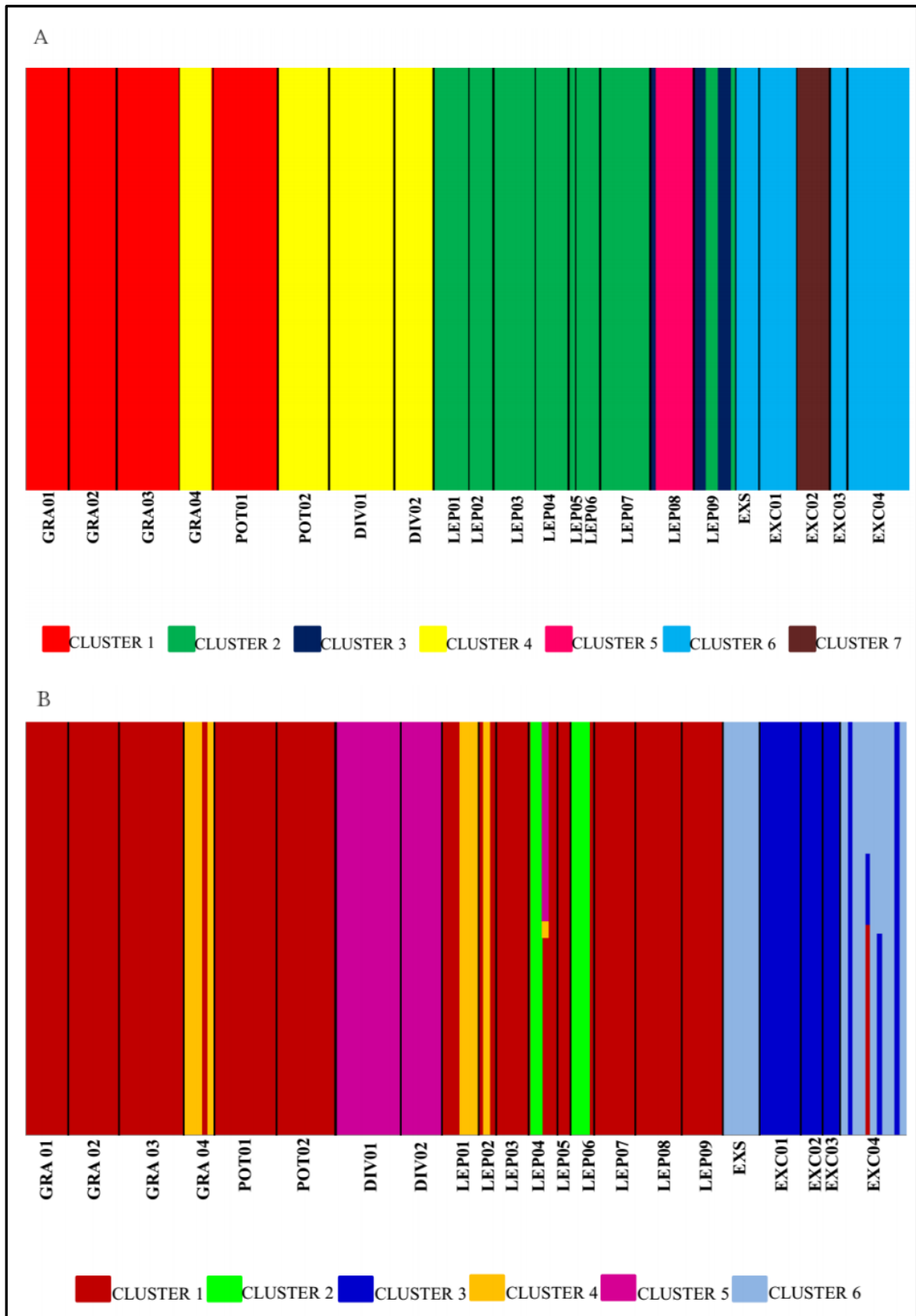


Figure 4



## Capítulo III

### Considerações Finais

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho está vinculado ao grupo de pesquisa do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que tem como foco principal a família Bromeliaceae, buscando compreender os aspectos biológicos, ecológicos, genéticos e evolutivos das espécies desta família através de diferentes abordagens de biologia molecular e genética.

O endemismo é uma característica marcante do gênero *Dyckia*, assim como o estado do Mato Grosso do Sul é interessante para os estudos filogeográficos por possuir uma fitogeografia complexa, compreendendo quatro biomas (Krapp *et al.*, 2014; Paggi *et al.*, 2015). A planície do Pantanal é circundada por cadeias de montanhas distintas, tanto em composição como em idade geológica (Junk *et al.*, 2006). No presente estudo se torna particularmente interessante a Serra de Maracaju que corta o estado do MS de norte a sul, dividindo-o em leste-oeste, nas bacias do rio Paraná e Paraguai, respectivamente (Hannibal & Neves-Godoy, 2015), onde espécies endêmicas e de distribuição restrita ocorrem ao longo de suas áreas de influência (*D. grandidentata*, *D. pottiorum* e *D. divaricata*). Outras espécies, como *D. excelsa* e *D. exserta* se distribuem do lado oeste da Serra, nas regiões do Pantanal, sul do Pantanal (região do Cerrado), e a sudoeste do Pantanal, na região Chaquenha. Os resultados apresentados no capítulo II deste trabalho, principalmente considerando o cpDNA, apontam uma alta estruturação entre os biomas (Cerrado vs Pantanal/Chaco), sendo evidenciado dois haplogrupos, o Cerrado (*D. grandidentata*, *D. pottiorum*, *D. divaricata*) e Pantanal/Chaco (*D. excelsa*, *D. exserta*), onde seis passos mutacionais separam as espécies endêmicas do Pantanal/Chaco das demais. Desta forma, tal resultado evidencia que a biogeografia histórica de tais biomas influenciou significativamente na especiação destes dois haplogrupos, sendo a Serra de Maracaju, e as diferenças de elevação do solo, do Cerrado em comparação à planície do Pantanal, sejam provavelmente a barreira geográfica de maior impacto nesta diferenciação entre estes dois haplogrupos.

O baixo compartilhamento de haplótipos do cpDNA, observado apenas entre *D. pottiorum* com *D. grandidentata* e *D. divaricata* e em populações de *D. leptostachya* ao longo de sua distribuição, possivelmente deve-se a um polimorfismo ancestral. Os resultados de alta estruturação e baixa diversidade entre as populações corroboram com

esta premissa, já que o fluxo gênico entre tais populações é dificultado pela distância geográfica entre elas. Os marcadores plastidial e nuclear apresentam tempo de coalescência diferentes (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013), sendo que os marcadores plastidiais são frequentemente utilizados para inferir uma história ancestral do grupo de espécies estudadas. Desta forma, a marca do polimorfismo ancestral evidenciada pelo resultado do cpDNA pode estar de acordo com os eventos de radiação descritos até o momento para o gênero *Dyckia*. Krapp *et al.* (2014) descreveram um primeiro evento de migração do gênero para o sul do Brasil, e um segundo evento do sul do País em direção às regiões de atual distribuição do gênero, o que está de acordo com a distribuição do haplótipo H5 em *D. leptostachya*, que ocorre desde o MS até o RS, e dos haplótipos H1 e H3 em *D. gradidentata*, *D. pottiorum* e *D. divaricata*, que ocorrem de norte à sul do estado do MS.

A alta estruturação e baixa diversidade genética do cpDNA em oposição ao nuDNA, sugere que a dispersão via pólen, realizada por abelhas, borboletas e beija-flores é mais eficiente que a dispersão por semente que ocorre pelo vento (Vosgueritchian e Buzato, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009; Rogalski *et al.*, 2009 Krapp *et al.*, 2014). Já a alta diversidade genética apresentada pelo nuDNA pode ser por diversos motivos, entre eles recombinação, devido a origem biparental deste marcador (Avisé, 2009). O resultado da diversidade genética apresentada pelo cpDNA dentro das populações de espécies endêmicas corrobora com a ideia de que espécies de distribuição geográfica restrita tendem a apresentar baixa diversidade genética (Gibson *et al.*, 2008), contudo apesar da espécie amplamente distribuída, *D. leptostachya*, apresentar valores de diversidade maiores que as espécies endêmicas, estes valores não foram altos, sendo que cinco das nove populações analisadas apresentaram diversidade zero. Estes resultados corroboram com o fato desta espécie estar na lista de espécies ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul, na categoria vulnerável (Rio Grande do Sul, 2014).

No Pantanal existem 12 espécies da flora em uma das três categorias de ameaça (em perigo, vulnerável e criticamente em perigo), já o Cerrado apresenta 628 espécies da flora em uma das três categorias. Estes biomas vêm sofrendo ao longo dos anos com a intensa agricultura, pecuária, turismo, e mais recentemente o Pantanal com a ameaça de hidrovias e hidrelétricas. Para o Pantanal, 17 % de sua área são indicadas como prioridade alta para a conservação, já no Cerrado 76 microbacias, localizadas principalmente nos

estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul tem prioridade extremamente alta para a conservação (Loyola *et al.*, 2014).

Desta forma, o presente trabalho enfatiza a necessidade de conservação destes biomas devido à sua alta biodiversidade e níveis de endemismo, como o caso das espécies de *Dyckia* estudadas nesta dissertação. Os resultados deste estudo, de forma geral, apresentaram uma diversidade única em suas populações, sendo que a perda de qualquer uma destas terá um grande impacto na manutenção e continuidade destas espécies. Além das espécies de *Dyckia* endêmicas do Cerrado e do Pantanal/Chaco, chama-se a atenção para a conservação da espécie de ampla distribuição, *D. leptostachya*, especialmente no sul do Brasil, onde as populações no RS e a espécie já se encontram na lista da flora ameaçada do estado, sendo que em Santa Catarina a espécie é considerada possivelmente extinta (Consema, 2014).



## Capítulo IV

### Referências Bibliográficas (Capítulos I e III)

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assine ML, Soares PC (2004) Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International*, 114: 23-34.
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Benzing DH (2000) Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 690 p.
- Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C (2010) Genetic Structure of the xerophilous bromeliad *Pticaoiria geyskesii* on iselbergs in French Guiana- a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography*, 33: 175-184.
- Braun PJ, Pereira EE (2008) Succulent and Xeromorphic Bromeliads of Brazil Part 4. *Dyckia richardii* and *D. grandidentata*, two new succulent and heavily-armed species from west-central Brazil. *Cactus and Succulent Journal*, 80 (6): 319-324.
- Consema- Conselho Estadual de Meio Ambiente de Santa Catarina (2014). Resolução Consema Nº 51, de 5 de dezembro de 2014. Reconhece a Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado de Santa Catarina e dá outras providências. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/upload/Flora/resconsema51.pdf> (último acesso em 17.03.2016).
- Duarte EF, Carneiro IF, Rezende MH (2009) Morfologia de Frutos e Sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae). *Revista de Biologia Neotropical*, 6(1): 1-12.
- Gibson JP, Rice SA, Stucke CM (2008) Comparison of population Genetic Diversity Between a Rare, Narrowly Distributed Species and a Common, Widespread Species of *Alnus* (Betulaceae). *American Journal of Botany*, 95(5): 588-596.
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of Genetic Variation in Rare and Widespread Plant Congeners. *American Journal of botany*, 87 (6): 783-792.
- Givnish TJ, Milliam KC, Berry PE e Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23: 3-26.
- Givnish, TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC *et al* (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872-895.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evan TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ (2014) Adaptive radiation, correlated and contingent

- evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71: 55–78.
- Goetze M (2014) Especiação e Diversidade Genética no subgênero *Ortgiesia* (*Aechmea*, Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 132p.
- Goetze M, Büttow MV, Zanella CM, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro FG, Sampaio JAT, Palma-Silva C, Cidade FW, Bered F (2015) Genetic Variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58: 204-210.
- Guimarães E, Trevelin CC, Manoel OS (2014) Pantanal: Paisagens, Flora e Fauna. São Paulo: Cultura Acadêmica, 1.ed. 80p.
- Hannibal W, Neves-Godoi M (2015) Non-volant mammals of the Maracaju Mountains, southwestern Brazil: composition, richness and conservation. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86: 217-225.
- Junk, WJ, Cunha CN (2005) Pantanal: a large South American Wetland at a crossroads. *Ecological Engineering*, 24, 391-401.
- Junk WJ, Cunha CN, Wantzen KM, Petermann P, Strüßmann C, Marques MI, Adis J (2006) Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences*, 68: 278-309.
- Kartzinel TR, Campbell DA, Trapnell DW (2015) Spatial Patterns of Haplotype Variation in the Epiphytic Bromeliad *Catopsis nutans*. *Biotropica*, 0 (0): 1-12.
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, Weising K (2014) Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematics and Evolution*, DOI 10.1007/s00606-014-0985-0.
- Lavergne S, Thompson JD, Garnier E, Debussche M (2004) The biology and Ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *OIKOS*, 107: 505-518.
- Leme EMC e Marigo LC (1993) Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro, 183 pp.
- Leme EMC, Ribeiro OBC e Miranda ZJG (2012) New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. *Phytotaxa*, 67: 9-37.
- Leme EMC, Büneker HM (2015) A new *Dyckia* species from Mato Grosso do Sul, central Brazil. *J. Bromeliad Soc*, 65 (2): 129-136.
- Loyola R, Machado N, Vila Nova D, Martins E, Martinelli G (2014) Áreas Prioritárias para a Conservação e uso Sustentável da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Realização: CNCFlora ( Centro Nacional de Conservação da Flora do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro) e CB-Lab (Laboratório de

- Biogeografia da Conservação da Universidade Federal de Goiás). Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, 80p.
- Novaes RML, Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2013) Concordance between Phylogeographical and Biogeographical Patterns in the Brazilian Cerrado: Diversification of the Endemic Tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). PLOS One, 8: 1-13.
- Paggi GM, Louzada RB, Ishii IH, Takahasi A, Arruda RCO, Lorenz-Lemke AP (2015) Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: Taxonomy, Geographic Distribution, and Notes of Leaf Anatomy. Systematic Botany, 40 (1), p.129-135.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini (2009) Range-Wide Patterns of Nuclear and Chloroplast DNA Diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical Forest Species. Heredity, 103:503-512.
- Pereira AR, Pereira TS, Rodrigues AS, Andrade ACS (2008) Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. ACTA Botânica Brasilica, 22 (4): 1150-1162.
- Pennington RT, Lavin M, Oliveira-Filho A (2009) Woody Plant Diversity, Evolution, and Ecology in the Tropics: Perspectives from Seasonally Dry Tropical Forest. The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 40: 437-457.
- Pott A, Pott VJ, Damasceno-Júnior GA (2009) Fitogeografia do Pantanal. III Congresso Latino Americano de Ecologia (III CLAE) e IX Congresso Brasileiro de Ecologia (IX CEB), 10 a 17/setembro, São Lourenço, Minas Gerais, Brasil.
- Ravikanth G, Nageswara-Rao M, Narwade A, Shaanker RU, Ganeshaiah KN (2010) Do endemic Rattans Have Lower Genetic Variability than Their Co-generic and Con-specific Non-endemic Rattans? Gene, Genomes and Genomic, 4 (Special Issue 1):22-27.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR, Lovato MB (2007) Phylogeography of the Tree *Hymenae stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the Influence of Quaternary Climate Changes in the Brazilian Cerrado. Annals of Botany, 100: 1219-1228.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2009) Phylogeographical Structure of the Neotropical Forest Tree *Hymenae courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenae stigonocarpa* from Cerrado. Journal of Heredity, 100(2): 206-216.
- Reitz R (1983) Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. Flora Ilustrada Catarinense, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.

- RIO GRANDE DO SUL (2014). Decreto 52.109 de 19 de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20141222103647doe.pdf> (último acesso em 17.03.2016).
- Rogalski JM, Reis A, Reis MS, Hmeljevski KV (2009) Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. Revista Brasileira de Botânica, V.32, n.4, p. 691-702.
- Santos-Silva F, Saraiva DP, Monteiro RF, Pita P, Mantovani A, Forzza RC (2013) Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it?. Flora, 208: 508-521.
- Silva JSV, Caputo ACB (2010) Localização e distribuição da Vegetação Savana Estépica (Chaco) no Pantanal Brasileiro. Anais 3º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal, Cáceres, MT. 16 a 20/Outubro. Embrapa Informática Agropecuária/INPE, p314-323.
- Smith LB e Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcairnioideae). Flora Neotropica Monografia, 14:1-662.
- Souza CA, Lani JL, Sousa JB (2006) Origem e Evolução do Pantanal Mato-Grossense. VI Simpósio Nacional de geomorfologia. Geomorfologia tropical e subtropical: processos, métodos e técnicas. 6 a 10/setembro. Goiânia, Brasil.
- Turchetto C, Segatto ALA, Mäder G, Rodrigues DM, Bonatto S, Freitas LB (2016) High Levels of Genetic Diversity and Population Structure in an Endemic and rare Species: Implications for Conservation. AoB Plants, v. 1p. doi: 10.1093/aobpla/plw002.
- Turchetto-Zolet AC, Cruz F, Vendramin GG, Simon MF, Salgueiro F, Margis-Pinheiro M, Margis R. (2012). Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae) Molecular Phylogenetics and Evolution 65:174-182.
- 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.
- Vosgueritchian SB, Buzato S (2006) Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. Revista Brasileira de Botânica, V.29, n.3, p. 433-442.
- Werneck FP (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. Quaternary Science Reviews, 30: 1630-1648.
- Zanella CM, Janck A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F (2012) Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. Genetics and Molecular Biology, 35: 1020-1026.
- Zanella CM (2013) Padrões históricos e processos de hibridação entre duas espécies simpátricas de bromélias da Mata Atlântica: Implicações evolutivas e conservacionistas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 127p.

**Endereço eletrônico Consultado:** Rede *SpeciesLink* (<http://www.splink.org.br/>), último acesso maio/2016:

***Dyckia excelsa*:** *Herbário do Instituto de Ciências Naturais (ICN), Herbário UFMT (UFMT) disponível na rede speciesLink* (<http://www.splink.org.br>) em **09 de Maio de 2016 às 10:23**.

***Dyckia leptostachya*:** *Herbário Irina Delanova Gemtchújnicov (BOTU), Herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), Herbário da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CGMS), Herbário CPAP da Embrapa Pantanal (CPAP), Field Museum of Natural History - Brazilian records (F), Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL), Herbário Alarich Rudolf Holger Schultz (HAS), Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão (HCF), Herbario Jataiense Prof. Germano Guarim Neto (HJ), Herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS), Herbarium Uberlandense (HUFU), Herbário do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Herbário do Instituto de Ciências Naturais (ICN), Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM), Missouri Botanical Garden - Brazilian records (MOBOT\_BR), The New York Botanical Garden - Brazilian records (NY), Herbarium Anchieta (PACA-AGP), Herbário da Universidade de Brasília (UB), Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC), Herbário UFP - Geraldo Mariz (UFP), Herbário do Departamento de Botânica (UPCB) disponível na rede speciesLink* (<http://www.splink.org.br>) em **09 de Maio de 2016 às 10:38**.