

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Diversidade e estrutura genética em *Dyckia excelsa*: uma espécie  
ameaçada dos afloramentos rochosos ferruginosos (*cangas*) no  
bioma Pantanal**

Renata de Barros Ruas

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

Orientadora: Fernanda Bered

Colaboradora: Gecele Matos Paggi

Porto Alegre, março de 2018

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 (Edital Casadinho/Procad-CNPq proc: 552352/2011-0).

A mestrandona obteve bolsa de estudos do CNPq (24 meses).

Dedico à minha avó Petrona Pereira Gonçalves  
Ruas, incentivadora incansável de meus estudos.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais e a minha avó, que sempre me apoiaram nos estudos e pelo amor incondicional.

À minha orientadora Fernanda Bered, pela orientação, pela paciência e dedicação na execução do projeto.

À minha orientadora da graduação e colaboradora deste projeto, Gecele Matos Paggi, por apresentar o maravilhoso mundo das bromélias e pela ajuda nos estudos para a seleção de mestrado.

As meninas do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, Camila Aguiar, Luiza Hirsch, Laís Mara e Cristina Todeschini, por todo o auxílio, pela convivência e por terem me recebido muito bem no laboratório.

À Márcia Goetze por todas as dúvidas sanadas com rapidez em relação às análises.

Aos professores do PPGBM por todos os conhecimentos adquiridos.

Ao Elmo, pela eficiência em solucionar as necessidades relacionadas à pós.

Aos meus amigos do mestrado, Augusto Santos, Camila Gazolla, Raíssa Caldeira e Yelena Perevalova, pelas risadas, companheirismo e grupos de estudo.

Às meninas do Laboratório de Genética do Campus do Pantanal, Brenda Brandão e Fernanda Godoy, pela amizade e pela ajuda com o projeto.

Ao Maurício Lenzi, pela amizade e na ajuda das coletas.

À minha prima, Marcia Raquel, que através da Fundação do Meio Ambiente de Corumbá, possibilitou a realização das coletas.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

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

Muito obrigada!

## Sumário

<b>Resumo</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo I:</b> Introdução geral	<b>10</b>
I.1: Os afloramentos rochosos ferruginosos – <i>cangas</i>	<b>11</b>
I.2: A família Bromeliaceae	<b>14</b>
I.3: Diversidade, estrutura genética e conservação na família Bromeliaceae	<b>16</b>
I.4: Marcadores Moleculares e seu uso em genética da conservação	<b>19</b>
I.5: O gênero <i>Dyckia</i> e <i>Dyckia excelsa</i>	<b>21</b>
I.6: Justificativa	<b>23</b>
<b>Capítulo II:</b>	
Objetivos	<b>24</b>
II. 1: Objetivo geral	<b>25</b>
II. 2: Objetivos específicos	<b>26</b>
<b>Capítulo III:</b> Strong genetic structure in <i>Dyckia excelsa</i> (Bromeliaceae), an endangered species from ironstone outcrops, Pantanal, Brazil	<b>27</b>
Abstract	<b>29</b>
Introduction	<b>30</b>
Materials and Methods	<b>32</b>
Results	<b>36</b>
Discussion	<b>38</b>
References	<b>42</b>
<b>Capítulo IV: Considerações finais</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo V: Referências Bibliográficas</b>	<b>72</b>

## Resumo

O bioma Pantanal, no estado de Mato Grosso do Sul, é considerado uma das áreas que sofre os mais fortes impactos antrópicos no estado. Grandes planícies alagadas como o Pantanal, são compostas de diferentes subsistemas, classificados como ecossistemas ou habitats. Dentre as fitofisionomias presentes na região do Pantanal, estão as *cangas* – afloramentos rochosos ferruginosos formados por material detritíco derivado de rochas próximas ricas em ferro. Em consequência do seu isolamento ecológico e espacial, os afloramentos rochosos são considerados “ilhas terrestres”. A família Bromeliaceae possui uma série de inovações que permitiram sua colonização e especiação em ambientes sob estresse. O gênero *Dyckia* pertence à subfamília Pitcairnioideae e é o segundo maior gênero dessa. As espécies de *Dyckia* se caracterizam por serem xeromórficas, rupícolas, adaptadas a ambientes extremos e altamente expostos ao sol, como as *cangas*. *Dyckia excelsa* é uma espécie que possui distribuição restrita e foi recentemente descoberta nos afloramentos rochosos ferruginosos localizados no Planalto Residual do Urucum, em Corumbá, Mato Grosso do Sul. Devido à escassez de conhecimentos sobre aspectos genéticos e biológicos da flora Pantaneira, este estudo teve como objetivo geral acessar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Dyckia excelsa*, as quais são importantes para compreender a dinâmica evolutiva no Pantanal, assim como estabelecimento de estratégias de conservação de Bromeliaceae e das regiões onde elas ocorrem. Para isso, dados moleculares foram correlacionados com dados geográficos de ocorrência da espécie. Oito marcadores moleculares do tipo microssatélites nucleares e duas sequências de regiões intergênicas plastidiais foram utilizados, buscando acessar padrões contemporâneos e históricos que levaram a diversificação desta espécie. Quanto aos processos contemporâneos, acessados pelo marcador nuclear, a diversidade genética mostrou-se baixa nas populações ( $H_0 = 0$  a  $H_0 = 0,238$ ), padrão encontrado também em outras espécies endêmicas do mesmo gênero. Apesar disto, quase todas as populações não apresentaram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, provavelmente devido à auto-incompatibilidade da espécie que leva ao cruzamento obrigatório com outros indivíduos. As populações são altamente estruturadas ( $F_{ST} = 0,437$ ;  $G'_{ST} = 0,425$ ), sugerindo que a dispersão via pólen entre as *cangas* é limitada, corroborando a hipótese de isolamento entre ilhas terrestres provido pela mata adjacente. A maior proporção da variação genética é encontrada dentro das

populações (54,61%). Uma correlação entre distância genética e distância geográfica foi observada, através do teste de Mantel ( $P < 0.05$ ;  $r^2 = 0.2926$ ), indicando a presença de isolamento por distância entre os pontos coletados. A análise Bayesiana encontrou um  $K = 3$ , que corresponde às ilhas terrestres, separando as populações coletadas em três regiões geográficas. No que diz respeito aos padrões históricos da espécie, acessados pelos marcadores plastidiais, a baixa diversidade de haplótipos e a alta diferenciação entre as populações indica um grande período de isolamento entre as *cangas*. O mesmo padrão de estruturação genética das análises com dados nucleares foi encontrado, sugerindo que a dispersão via sementes entre os grupos também é limitada, padrão esperado pela morfologia da semente. O tempo de divergência dos haplótipos data do Pleistoceno (1,4 milhões de anos), época em que o Pantanal sofreu grandes modificações em sua paisagem, passando por períodos de aridificação e atividades tectônicas intensas. Apesar disso, não foram observados padrões de expansão ou contração das populações através dos testes de neutralidade e gargalo de garrafa, indicando estabilidade das populações nas *cangas*. Logo, estes afloramentos provêm oportunidades de refúgio, facilitando a persistência de populações adaptadas a este ambiente. Para estratégias de conservação, é altamente recomendado que *D. excelsa* seja preservada *in situ*, em qualquer localidade, já que esta apresenta uma identidade única em todos os locais em que ela se encontra. Exceto por uma pequena população, todas as outras estão em áreas desprotegidas, inclusive em área urbana, o que torna a sua conservação ainda mais desafiadora. O ambiente peculiar em que esta espécie se encontra contribui para a evolução de muitas espécies raras e endêmicas, mostrando a grande importância da conservação das diferentes paisagens do Pantanal.

## Abstract

The Pantanal biome, in the Mato Grosso do Sul state, is considered one of the areas heaviest impacted by humans. Large wetlands such as the Pantanal are composed by many different subsystems, ranked as ecosystems or habitats. The ironstone outcrops, also known as *cangas*, are ecosystems formed from the weathering product of underlying iron-formation present in the Pantanal region. In consequence of their spatial and ecological isolation, the ironstone outcrops are considered “terrestrial islands”. The family Bromeliaceae has key adaptations that allowed them to colonize arid environments. *Dyckia* is the second largest genus belonging to the Pitcairnioideae subfamily and its species prefer xeromorphic environments with high sunlight exposure, such as the *cangas*. *Dyckia excelsa* has a narrow geographical distribution and was recently described occurring on the ironstone outcrops located in the Urucum Residual Plateau, in Corumbá, Mato Grosso do Sul State. Due to the lack of knowledge about genetic and biological aspects of the Pantanal flora, the general objective in this study was to access the diversity and the structure genetic of natural populations of *D. excelsa*, which are important for understand the evolutionary dynamics in Pantanal, as well as conservation strategies of Bromeliaceae. For this, molecular data were correlated with the species geographic occurrence. We used eight nuclear microsatellites and two intergenic plastid DNA spacers aiming to access contemporary and historical patterns that led to the diversification of this species. For contemporary processes, accessed by the nuclear marker, genetic diversity was low in the populations ( $H_0 = 0$  to  $H_0 = 0.238$ ), pattern also found in other endemic species in this genus. Despite this, almost all populations did not show a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, probably due to the self-incompatibility of the species that leads to obligatory cross-breeding with other individuals. Populations are highly structured ( $F_{ST} = 0.437$ ;  $G'_{ST} = 0.425$ ), suggesting that pollen flow between *cangas* is limited, corroborating the hypothesis of isolation between terrestrial islands provided by adjacent forest. The highest proportion of genetic variation is found within populations (54.61%). A correlation between genetic distance and geographic distance was observed through the Mantel test ( $P < 0.05$ ;  $r^2 = 0.2926$ ), indicating presence of isolation by distance between the collected points. The Bayesian analysis found a  $K = 3$ , which correspond to the terrestrial islands, separating the populations collected in three geographic regions. Regarding the historical patterns of the species, accessed by the

plastidial marker, the low diversity of haplotypes and the high differentiation between the populations indicates a great period of isolation between the *cangas*. The same pattern of genetic structure with nuclear data was found, suggesting that seed dispersal between groups is also limited, as expected by the seed morphology. The time of divergence of the haplotypes dates from the Pleistocene (1.4 myA), when the Pantanal experienced major modifications in its landscape, passing through periods of aridification and intense tectonic activities. Despite this, population expansion or contraction patterns were not observed through neutrality and bottleneck tests, indicating population stability in the *cangas*. Therefore, these outcrops provide opportunities for refuging, enabling the persistence of populations adapted to this environment. For conservation strategies, it is highly recommended that *D. excelsa* be preserved in situ, in any location, since it has a unique identity wherever it is found. Except for a small population, all others are in unprotected areas, including in urban areas, which makes their conservation even more challenging. The peculiar environment in which this species is found contributes to the evolution of other rare and endemic species, showing the great importance of Pantanal landscapes for conservation purposes.

*Capítulo I*  
*Introdução geral*

## I.Introdução

### *I.1. Os afloramentos rochosos ferruginosos – “cangas”*

A fitogeografia do estado de Mato Grosso do Sul (MS), no centro-oeste do Brasil compreende cerca de 50% de espécies de ampla distribuição, 30% de espécies endêmicas do Cerrado, e 20% de outras origens (Pott e Ratter, 2011). Essas espécies estão distribuídas em três diferentes biomas: Cerrado (Savana), Pantanal e parte da Mata Atlântica (IBGE, 2004; Junk *et al.*, 2011). O bioma Pantanal está severamente ameaçado, e é considerado uma das áreas que sofre os mais fortes impactos antrópicos no estado (Cavalcanti e Joly, 2002; Junk *et al.*, 2011).

Com uma área de aproximadamente 140.000 km<sup>2</sup>, o Pantanal é a maior planície alagada tropical (Warren *et al.*, 2015). Grandes planícies alagadas como o Pantanal, são compostas de diferentes subsistemas, classificados como ecossistemas ou habitats. Esses subsistemas estão sujeitos a condições ambientais diferentes, abrigam comunidades de plantas e animais distintas e interagem entre si de diversas formas. A beleza de suas paisagens e sua grande diversidade de espécies é consequência dessa diversidade de habitats e representam um enorme interesse nessa região (Nunes da Cunha e Junk, 2011).

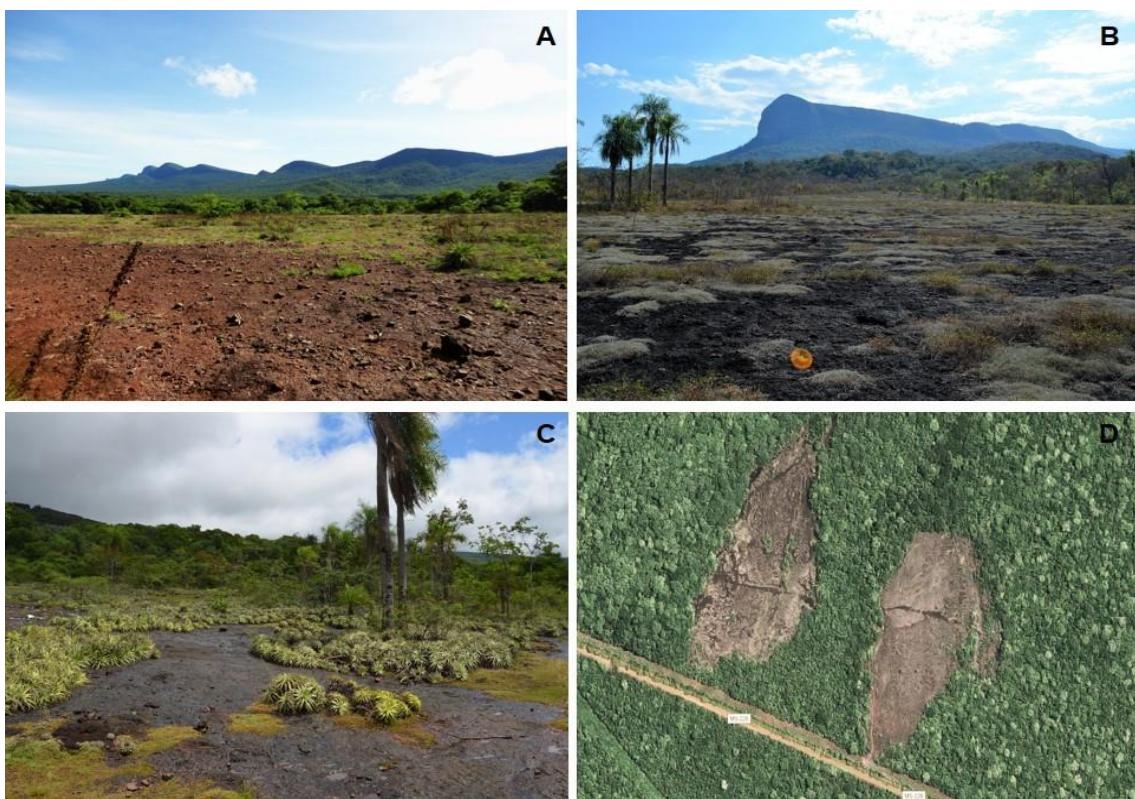
Dentre as paisagens presentes na região do Pantanal estão as *cangas*, afloramentos rochosos formados há milhões de anos resultante do intemperismo de rochas ferríferas subjacentes e posterior enriquecimento de ferro, que podem atingir dezenas de metros de espessura e se estender por milhares de hectares (Dorr II, 1969; Schobbenhaus e Coelho, 1986; Castro, 2008). No Pantanal, as *cangas* se encontram na região da Morraria do Urucum, nas cidades de Corumbá e Ladário (MS). Além disso, podem ser encontradas no Quadrilátero Ferrífero e ao longo da vertente leste da Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais, na Serra de Carajás no Pará e na região de Caetité na Bahia (Carmo *et al.*, 2012). Com frequência, as *cangas* distribuem-se insularmente nas porções mais altas do relevo, recobrindo jazidas de minério de ferro e constituindo extensos platôs interconectados por vales e escarpas (Dorr II, 1969; Carmo *et al.*, 2011). A vegetação associada às *cangas* abriga dezenas de espécies raras (*sensu* Giulietti *et al.*, 2009), várias destas novas para a ciência

(Viana e Lombardi, 2007; Jacobi e Carmo, 2008, 2012). Apesar disto, estas áreas possuem pouca representatividade dentro do sistema nacional de unidades de conservação de proteção integral (Jacobi *et al.*, 2011).

O Quadrilátero Ferrífero (MG), a Serra de Carajás (PA) e as Morrarias Residuais do Urucum e Amolar (MS) possuem as maiores reservas de minério de ferro do país e, por sua vez, a vegetação associada aos campos ferruginosos encontra-se ameaçada pela constante demanda mundial por este minério (Ginocchio e Baker, 2004). O Estado de Mato Grosso do Sul possui a terceira maior reserva em minério de ferro do país (17% do total) (Williams, 1943), concentrada na região das Morrarias Residuais do Urucum e Amolar. Embora a legislação ambiental brasileira determine a recuperação de áreas degradadas por mineração, o potencial da vegetação sobre *cangas* para este propósito ainda é pouco explorado (Jacobi *et al.*, 2008).

O Maciço do Urucum é uma formação de morros residuais situados ao longo da fronteira com a Bolívia, a oeste do rio Paraguai com altitude máxima de 1.060 m, constituindo o ponto mais alto do Mato Grosso do Sul, com uma área de 1.311 km<sup>2</sup> (Silva *et al.*, 2000). A riqueza botânica da área é alta, ocorrendo mais de 973 espécies de 116 famílias (Pott *et al.*, 2000), justificada principalmente pela grande variedade de fitofisionomias. Sendo assim, há ambientes de suma importância que permanecem ainda pouco estudados, particularmente as *cangas* do Maciço do Urucum (Takahasi e Meirelles, 2014). Em Corumbá, as *cangas* ocorrem nas áreas de drenagem (em torno de 100 m de altitude) das Morrarias do Urucum e do Rabicho (Figura 1).

Os afloramentos rochosos de forma geral, incluindo *inselbergs*, *cangas*, entre outros, são cobertos esparsamente por solo, e a maior parte da precipitação é rapidamente perdida pelo escoamento das águas. Já que as condições edáficas e microclimáticas nos afloramentos são extremas e diferem fortemente das paisagens ao redor, apenas uma fauna e flora especializadas, que sejam adaptadas a um baixo suprimento de água e altas temperaturas podem sobreviver neste ambiente. Consequentemente, a vegetação dos afloramentos é claramente diferenciada dos seus arredores (Porembski e Barthlott, 2000; Porembski, 2007).



**Figura 1.** (A, B e C) Aspecto geral dos afloramentos rochosos ferruginosos localizados no Mato Grosso do Sul; A – Fazenda São João; B- Parque Municipal de Piraputangas; C – Fazenda Monjolinho; Imagens da autora. D – Imagem de satélite dos afloramentos rochosos (Fazenda São João - Google Maps).

Há muita informação sobre afloramentos rochosos tropicais, resultado de estudos botânicos, fitogeográficos e ecológicos em diferentes litologias (Jacobi *et al.*, 2007). Entre os mais estudados na África e na América do Sul estão as domas graníticas/gnáissicas, conhecidas como *inselbergs* (Ibisch *et al.*, 1995; Groger e Barthlott, 1996; Porembski *et al.*, 1998; Meirelles *et al.*, 1999; Parmentier, 2003; Parmentier *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2006). A flora associada a esses ambientes também tem recebido muita atenção, assim como no caso dos *campos rupestres* no Brasil (Alves e Kolbek, 1994; Meguro *et al.*, 1994; Conceição e Pirani, 2005; Pirani *et al.*, 2003). Comparativamente, muito pouco é conhecido sobre as comunidades vegetais associadas a afloramentos rochosos ferruginosos (Jacobi *et al.*, 2007).

Em consequência do seu isolamento ecológico e espacial, os afloramentos rochosos são considerados “ilhas terrestres” (Porembski, 2007; Burke, 2012). Assim como nas ilhas oceânicas, é esperado que o fluxo gênico entre populações de diferentes afloramentos seja

dificultado pelo isolamento causado pela matriz adjacente (Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2017). Logo, espécies que ocorrem nessas manchas isoladas podem ter fluxo gênico reduzido, deriva genética significante e altos níveis de divergência populacional (MacArthur e Wilson, 1967).

O isolamento e a idade antiga desses afloramentos rochosos são refletidos no alto número de espécies endêmicas registradas (Seine *et al.*, 2000). Alguns autores têm sugerido que esses ambientes podem ter atuado como um refúgio para espécies xerófitas ou adaptadas ao frio durante os ciclos glaciais/interglaciais (Scarano, 2002; Spezzale e Ezcurra, 2012). Portanto, os afloramentos rochosos são ecossistemas promissores para estudos biogeográficos e evolutivos (MacArthur e Wilson, 1967).

Scarano (2007), ao discutir o panorama da produção do conhecimento sobre a vegetação associada aos afloramentos rochosos, destaca a necessidade urgente de acelerar estudos nesses ambientes, em especial nas áreas de *cangas*. Estas áreas constituem um dos sistemas menos conhecidos, onde a principal causa de perda de habitat e degradação deve-se à abertura de dezenas de cavas de extração de minério de ferro (Carmo *et al.*, 2012).

## *I.2. A família Bromeliaceae*

Bromeliaceae (76 gêneros, 3552 espécies, Gouda *et al.*, atualização contínua) é uma das maiores famílias de plantas com flores encontradas principalmente ou exclusivamente nos Neotrópicos (Stevens, 2013). Esta família é reconhecida como um dos melhores exemplos de radiação adaptativa – existe uma enorme diversidade de formas de vida, desde formas terrestres com raízes funcionais até epífitas completamente independentes do seu substrato para a nutrição (Pittendrigh, 1948; Benzing, 2000). Uma série de inovações que exigem a integração de um conjunto de características bioquímicas, anatômicas, fisiológicas e do organismo, permitiu a colonização e especiação bem-sucedida das bromélias em ambientes novos e sob estresse (Martin, 1994; Benzing, 2000; Crayn *et al.*, 2004, 2015; Givnish *et al.*, 2007, 2011, 2014; Males, 2016; Palma-silva *et al.*, 2016).

As bromélias são plantas típicas do Novo Mundo, com distribuição geográfica que vai desde os estados da Virgínia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos (limite norte), ao norte da Patagônia, na Argentina (limite sul). A única exceção é *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr distribuída no oeste da África, na região da Guiné (Porembski e

Barthlott, 1999), o que parece ter sido um evento de recente dispersão a longa distância (Givnish *et al.*, 2004). O Brasil é um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae, onde se pode encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas, representando um contingente significativo de espécies e tornando o país o mais importante centro de diversidade desse grupo (Leme e Marigo, 1993).

Esta família é constituída por plantas terrestres, rupícolas e epífitas, herbáceas, variando de plantas delicadas e de pequeno porte, como *Tillandsia recurvata* (L.) L., com alguns centímetros de comprimento, até plantas de grande porte, como *Puya raimondii* Harms, encontrada nos Andes, que chega a atingir mais de 10 metros de altura (Smith e Downs, 1974; Reitz, 1983; Moreira *et al.*, 2006). As bromélias apresentam grande variabilidade de formas, sendo em geral plantas bem características e ornamentais. Segundo Rizzini (1997) e Benzing (2000) os diferentes habitats e, especialmente, a natureza do substrato influenciam no aspecto da planta, que pode variar amplamente em tamanho e coloração das folhas, assim como na morfologia das flores.

Os tanques das bromélias abrigam uma grande diversidade de insetos e outros artrópodes, assim como rotíferos, nematódeos, copépodes, caranguejos, sapos, salamandras e cobras. Em um hectare de uma floresta úmida, estes tanques podem armazenar dezenas de milhares de litros de água da chuva, capturar centenas de quilogramas de húmus no alto da copa das árvores e fornecer fontes alimentares essenciais para muitos primatas e aves (Paoletti *et al.*, 1991; Leme, 1993; Sillett, 1994; Richardson, 1999; Benzing, 2000; Acevedo *et al.*, 2008; Zotz e Traunspurger, 2016). Os polinizadores incluem uma grande variedade de insetos, bem como beija-flores e morcegos (Benzing, 1980, 2000; Luther, 1993; Beaman e Judd, 1996; Smith e Till, 1998; Buzato *et al.*, 2000; Krömer *et al.*, 2006; Tschapka e von Helversen, 2007; Zanella *et al.*, 2012).

Atualmente, mais de 90 espécies de bromélias são utilizadas no mundo como fonte de fibras, forragem, medicinais, rituais místicos, alimentação humana, entre outros (Bennet *et al.*, 2001). Além disso, existe um grande interesse pela utilização de espécies dessa família como plantas ornamentais.

Apesar de serem plantas quase exclusivamente herbáceas, é notável sua diversidade ecológica, visto que as espécies são encontradas em diferentes tipos de substratos, bem como nos mais variados habitats (Fischer e Araújo, 1995; Benzing, 2000;), constituindo um sistema de estudo favorável às abordagens ecológicas e evolutivas. Em Bromeliaceae é

comum ocorrer a combinação entre dois sistemas reprodutivos: via produção de sementes, normalmente envolvendo a fusão de gametas, e via propagação clonal (Benzing, 2000).

### *I. 3. Diversidade, estrutura genética e conservação na família Bromeliaceae*

A genética da conservação se refere ao uso da teoria e técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas. Seu objetivo é preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais, através da elucidação de aspectos da biologia das espécies, relevantes para seu manejo e conservação (Frankham *et al.*, 2010).

A genética de populações tornou-se ferramenta importante por possibilitar a descrição da variabilidade genética em populações, bem como o estudo dos mecanismos de manutenção desta variabilidade (Nei, 1987). A estrutura genética das populações reflete a interação entre diferentes processos, incluindo a sua história evolutiva (distribuição, fragmentação de habitat, isolamento da população), mutações, deriva genética, sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção (Sales *et al.*, 2001), as quais podem ajudar a compreender os processos de adaptação a circunstâncias ecológicas particulares (Parker *et al.*, 1998). Incrementos nos níveis de diversidade genética ocorrem por meio de mutações que geralmente ocorrem a taxas muito baixas e, por isso, sua importância na genética de populações restringe-se a uma perspectiva de longo prazo, cerca de centenas a milhares de gerações (Allendorf e Luikart, 2007). Perdas de diversidade ocorrem com frequência muito maior e por um grande número de fatores, como, por exemplo, deriva genética, endogamia, seleção natural, e reduções do tamanho populacional. Fatores relacionados à ação antrópica frequentemente reduzem as populações a tamanhos nos quais as espécies ficam suscetíveis a efeitos acidentais ou estocásticos. Por isso, a investigação desses aspectos em populações naturais é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo, especialmente para espécies raras, em perigo de extinção, com poucas e/ou pequenas populações e com sistemas reprodutivos que dificultam o manejo (Frankham *et al.*, 2010; Gitzendanner *et al.*, 2012).

Os trabalhos publicados sobre a estrutura e a diversidade genética de populações naturais da família Bromeliaceae ainda são poucos em comparação ao número de espécies conhecidas, pois dos 76 gêneros e aproximadamente 3550 espécies descritas (Gouda *et al.*,

atualização contínua), 45 espécies de onze gêneros (Tabela 1) foram estudadas: *Aechmea* Ruiz & Pav. (Murawski e Hamrich, 1990; Izquierdo e Piñero, 2000; Zanella *et al.*, 2012; Goetze *et al.*, 2015, 2016, 2017, 2018; Loh *et al.*, 2015; Sheu *et al.*, 2017; Meireles e Manos 2018), *Alcantarea* (E.Morren ex Mez) Harms. (Barbará *et al.*, 2007, 2009; Zanella *et al.*, 2012; Lexer *et al.*, 2016), *Billbergia* Thunb. (Sheu *et al.*, 2017), *Bromelia* L. (Zanella *et al.*, 2011, 2012), *Dyckia* Schult. & Schult. f. (Hmeljevski *et al.*, 2011; Zanella *et al.*, 2012; Rogalski *et al.*, 2017), *Encholirium* Mart. ex Schult.f. (Cavallari *et al.*, 2006; Zanella *et al.*, 2012; Hmeljevski *et al.*, 2015, 2017; Gonçalves-oliveira *et al.*, 2017), *Lymania* Read (Pamponet *et al.*, 2013), *Pitcairnia* L'Hér. (Boisselier-Dubayle *et al.*, 2010; Sarthou *et al.*, 2010; Palma-Silva *et al.*, 2011; Zanella *et al.*, 2012; Souza-Sobreira *et al.*, 2015), *Puya* Molina (Sgorbati *et al.*, 2004), *Tillandsia* L. (Soltis *et al.*, 1987; González-Astorga *et al.*, 2004; Zanella *et al.*, 2012) e *Vriesea* Lindl. (Alves *et al.*, 2004; Palma-Silva *et al.*, 2009; Zanella *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013; Lavor *et al.*, 2014; Neri *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2018).

As populações naturais de espécies da família Bromeliaceae estão sendo reduzidas pela ação antrópica destrutiva de seu habitat, devido a fatores como o aumento do extrativismo ilegal e a fragmentação e/ou destruição dos habitats, causando uma redução no número de indivíduos, o que pode levar a perda da diversidade genética nas populações, colocando em risco a conservação destas plantas (Bered *et al.*, 2007). Poucos estudos na família conectam dados genéticos com planos de conservação, apesar destes dados serem úteis para tomada de decisões conservacionistas (revisado por Zanella *et al.*, 2012). Considerações sobre reprodução clonal e sexuada, demografia, estrutura genética dentro e entre populações e fluxo gênico em Bromeliaceae são de importância primária no desenvolvimento de estratégias de conservação (Bizoux and Mahy, 2007). Muitas espécies estão distribuídas em biomas ameaçados, são endêmicas, ou tem uma distribuição restrita, ameaçando a sobrevivência de muitos membros dessa família (Zanella *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Estudos de diversidade e estrutura genética de populações naturais na família Bromeliaceae e os marcadores moleculares utilizados.

Espécie	Marcador molecular	Autor
<i>Aechmea blumenavii</i>	cpDNA e phyC	Goetze <i>et al.</i> , 2017
<i>Aechmea calyculata</i>	cpDNA e phyC	Goetze <i>et al.</i> , 2016, 2017
<i>Aechmea caudata</i>	cpDNA e phyC	Goetze <i>et al.</i> , 2017
<i>Aechmea comata</i>	cpDNA e phyC	Goetze <i>et al.</i> , 2017
<i>Aechmea kertesziae</i>	cpDNA e phyC	Goetze <i>et al.</i> , 2017, 2018
<i>Aechmea kleinii</i>	cpDNA e phyC	Goetze <i>et al.</i> , 2017
<i>Aechmea magdalenae</i>	Aloenzimas	Murawski e Hamrich, 1990
<i>Aechmea nudicaulis</i>	SSR e cpDNA	Loh <i>et al.</i> , 2015, Sheu <i>et al.</i> , 2017, Meireles e Manos 2018
<i>Aechmea ramosa</i>	SSR	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Aechmea tuitensis</i>	Aloenzimas	Izquierdo e Piñero, 2000
<i>Aechmea winkleri</i>	SSR, cpDNA e phyC	Goetze <i>et al.</i> , 2015, 2017
<i>Alcantarea brasiliiana</i>	SSR	Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea geniculata</i>	SSR	Barbará <i>et al.</i> , 2007, Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea glaziouana</i>	SSR	Barbará <i>et al.</i> , 2009
<i>Alcantarea imperialis</i>	SSR	Barbará <i>et al.</i> , 2009, Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea martinellii</i>	SSR	Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea nevaresii</i>	SSR	Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea regina</i>	SSR	Barbará <i>et al.</i> , 2009
<i>Billbergia euphemia</i>	SSR	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Billbergia horrida</i>	SSR	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Bromelia antiacantha</i>	SSR	Zanella <i>et al.</i> , 2011
<i>Dyckia brevifolia</i>	Aloenzimas	Rogalski <i>et al.</i> , 2017
<i>Dyckia ibiramensis</i>	Aloenzimas	Hmeljevski <i>et al.</i> , 2011
<i>Encholirium biflorum</i>	RAPD	Cavallari <i>et al.</i> , 2006
<i>Encholirium horridum</i>	SSR	Hmeljevski <i>et al.</i> , 2015, 2017
<i>Encholirium pedicellatum</i>	RAPD	Cavallari <i>et al.</i> , 2006
<i>Encholirium spectabile</i>	SSR	Gonçalves-oliveira <i>et al.</i> , 2017

<i>Encholirium subsecundum</i>	RAPD	Cavallari <i>et al.</i> , 2006
<i>Lymania azurea</i>	RAPD	Pamponet <i>et al.</i> , 2013
<i>Lymania smithii</i>	RAPD	Pamponet <i>et al.</i> , 2013
<i>Pitcairnia albiflos</i>	SSR	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2011
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	SSR e Aloenzima	Boisselier-Dubayle <i>et al.</i> , 2010, Sarthou <i>et al.</i> , 2010
<i>Pitcairnia flammea</i>	ISSR	Souza-Sobreira <i>et al.</i> , 2015
<i>Pitcairnia staminea</i>	SSR	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2011
<i>Puya raimondii</i>	AFLP	Sgorbati <i>et al.</i> , 2004
<i>Tillandsia achyrostachysd</i>	Aloenzimas	González-Astorga <i>et al.</i> , 2004
<i>Tillandsia ionantha</i>	Aloenzimas	Soltis <i>et al.</i> , 1987
<i>Tillandsia recurvata</i>	Aloenzimas	Soltis <i>et al.</i> , 1987
<i>Vriesea cacuminis</i>	ISSR	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
<i>Vriesea friburgensis</i>	Aloenzimas	Alves <i>et al.</i> , 2004
<i>Vriesea gigantea</i>	SSR	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2009
<i>Vriesea minarum</i>	SSR	Lavor <i>et al.</i> , 2014
<i>Vriesea reitzii</i>	SSR	Soares <i>et al.</i> , 2018
<i>Vriesea scalaris</i>	SSR	Neri <i>et al.</i> , 2017
<i>Vriesea simplex</i>	SSR	Neri <i>et al.</i> , 2017

#### I. 4. Marcadores Moleculares e seu uso em genética da conservação

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

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) são marcadores codominantes, normalmente isolados de regiões não codificantes e espécie-específicos. Deste modo, estes marcadores podem ser utilizados para ajudar a resolver

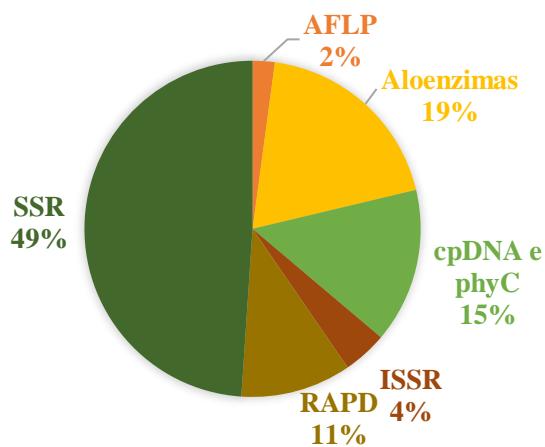
problemas que variam desde a taxonomia, questões relacionadas à paternidade, à estrutura genética de populações, comparação entre espécies, sistema de cruzamento, especialização ecológica e capacidade de colonização de populações (Parker *et al.*, 1998, Boneh *et al.*, 2003).

Como os locos de microssatélites são espécie-específicos, é necessário isolá-los para cada espécie. Porém, a presença de regiões flankeadoras conservadas permite a amplificação desses locos em espécies próximas (Barbará *et al.*, 2007a). O alto grau de polimorfismo observado na espécie para a qual os locos foram descritos pode ocasionalmente não ser observado em espécies relacionadas, especialmente quando aumenta a distância evolutiva entre as mesmas (Rubinsztein *et al.*, 1995). No caso da família Bromeliaceae, para a qual existem relatos de ampla radiação adaptativa acarretando em baixos níveis de divergência nas sequências de DNA, os marcadores são transferíveis entre espécies da mesma subfamília e até entre as subfamílias (Barbará *et al.*, 2007b, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008; Wöhrmann e Weising, 2011; Wöhrmann *et al.*, 2012; Zanella *et al.*, 2012b; Goetze *et al.*, 2013, 2015; Lavor *et al.*, 2014; Hmeljevski *et al.*, 2015, 2017; Loh *et al.*, 2015; Neri *et al.*, 2015, 2017; Lexer *et al.*, 2016; Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Sheu *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2018).

As plantas possuem dois genomas citoplasmáticos – mtDNA e o DNA do cloroplasto (cpDNA). O cpDNA é transmitido maternalmente na maioria das espécies, biparentalmente em algumas e paternalmente em outras (notavelmente, a maioria das gimnospermas). Esta molécula tende a evoluir em um ritmo muito vagaroso em relação ao rearranjo de genes e de sequenças primárias, além de não sofrer recombinação. Por essa razão, as sequências de cpDNA têm sido muito úteis para estimativas de relações filogenéticas entre diferentes espécies de plantas. Além disso, com esforços no sequenciamento, uma variação genética suficiente pode ser encontrada para abordagens filogenéticas em indivíduos dentro de uma mesma espécie em particular (Avise, 2009). Em Bromeliaceae, regiões do DNA plastidial foram utilizadas em estudos de genética populacional apenas em oito espécies do gênero *Aechmea* (Goetze *et al.*, 2016, 2017, 2018; Meireles e Manos, 2018).

Devido às suas altas taxas de mutação, os microssatélites refletem um padrão mais recente de dispersão de pólen e sementes, comparados ao DNA plastidial (Provan *et al.*, 2001). Por isso, o uso de diferentes marcadores moleculares, herdados biparentalmente (SSR) e uniparentalmente (cpDNA), podem informar aspectos contemporâneos e históricos,

respectivamente, que estão por trás da história evolutiva de uma espécie (Scotti-Saintagne *et al.*, 2013) e irão ajudar a entender os principais fatores responsáveis para os níveis de estrutura genética intraespecíficos encontrados (Goetze *et al.*, 2018). A Figura 2 e a Tabela 1 apresentam a frequência em que os diferentes tipos de marcadores foram utilizados em estudos de diversidade e estrutura genética na família Bromeliaceae. Os marcadores codominantes foram os mais utilizados até o momento, seguido pelos marcadores aloenzimáticos.



**Figura 2.** Frequência de marcadores moleculares utilizados em estudos de diversidade e/ou estrutura genética na família Bromeliaceae.

### I. 5. O gênero *Dyckia* e *Dyckia excelsa*

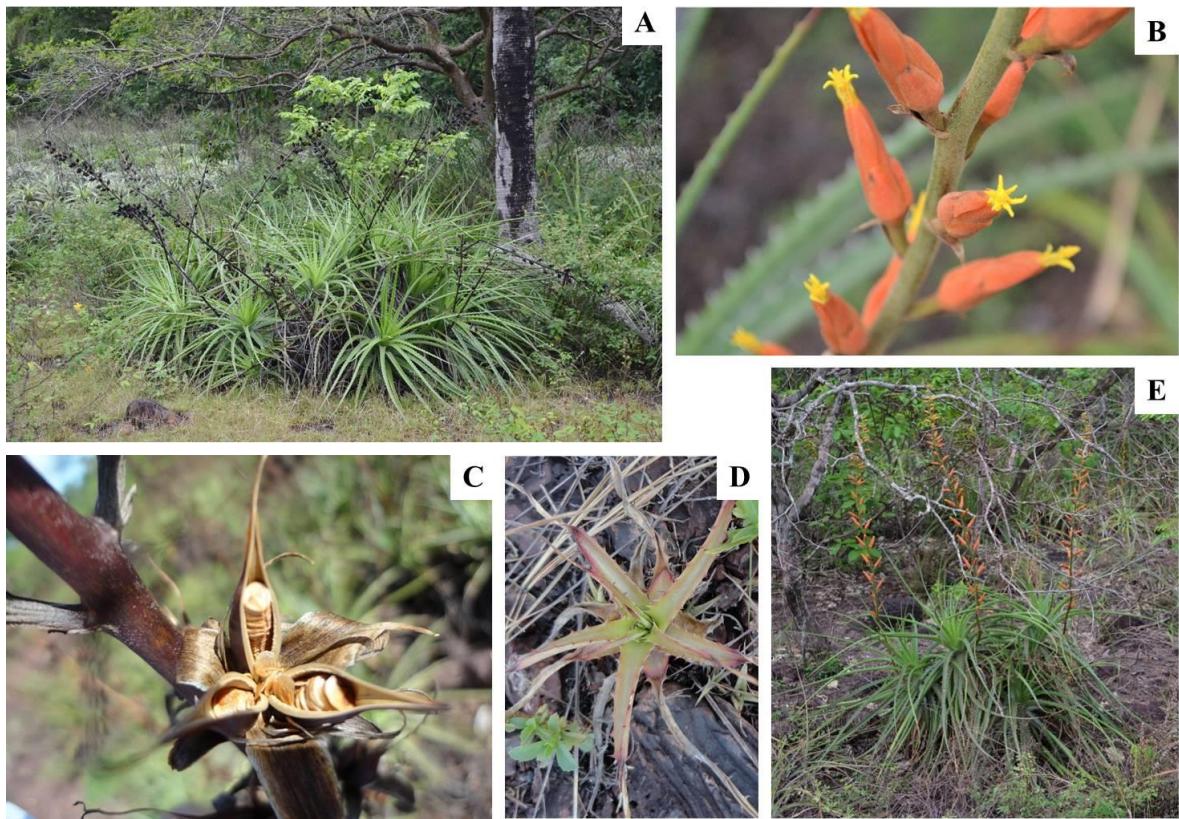
A subfamília Pitcairnioideae pertence à família Bromeliaceae, com 16 gêneros (Forzza *et al.*, 2015) e aproximadamente 678 espécies (Smith e Downs, 1974). O gênero *Dyckia* Schult. & Schult f. (1830: 1194) pertence à Pitcairnioideae e é o segundo maior gênero nesta subfamília, com 172 espécies (Gouda *et al.*, atualização contínua). Este gênero está distribuído no sul, sudeste, oeste e nordeste do Brasil, e nas regiões norte da Argentina, Paraguai, Bolívia e Uruguai (Smith e Downs 1974; Givnish *et al.*, 2007, 2011, 2014). Cerca de 80% das espécies conhecidas são encontradas no Brasil, sendo que de aproximadamente 130 espécies, 112 são endêmicas (Forzza *et al.*, 2015). O gênero possui ocorrências desde o nível do mar até 1000 metros de altitude, geralmente em ambientes expostos ao sol nos biomas de Restinga, Floresta Atlântica, Caatinga, Campos Rupestres e Cerrado. 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). Níveis

elevados de riqueza de espécies e uma grande proporção de espécies estritamente endêmicas deste gênero têm sido descritos em “campos rupestres” (Versieux e Wendt, 2006,2007; Versieux *et al.*, 2008).

Os espécimes deste gênero podem ser encontrados como indivíduos únicos, formados por dispersão de sementes ou densos aglomerados cespitosos (moitas), formados por propagação clonal. As espécies de *Dyckia* se caracterizam por serem xeromórficas, rupícolas, algumas são de ambientes úmidos ou periodicamente inundados (Leme *et al.*, 2012).

Este gênero é caracterizado por suas folhas coriáceas ou suculentas distribuídas em forma de rosetas sem tanques de captação de água, frequentemente dotadas de espinhos marginais e porte variado. As sementes são normalmente dispersas pelo vento, ou pela água no caso de algumas espécies adaptadas a ambientes periodicamente inundados, como a reófita *D. brevifolia* Baker (Leme *et al.*, 2012). Este gênero tem como polinizadores principais os beija-flores, mas insetos, como abelhas e borboletas, também já foram relatados (Vosgueritchian e Buzato, 2006, Rogalski *et al.*, 2009;). Apresentam exclusivamente inflorescência racemosa lateral, simples ou ramificada, podendo ser amarela, vermelha e laranja as cores predominantes, embora existam registros de flores de cor vinho-acastanhado e esverdeados. As espécies de *Dyckia* exibem propagação vegetativa por meio de rizomas curtos ou longos (Givnish *et al.*, 2007; Leme *et al.*, 2012; Büneker *et al.*, 2013).

*Dyckia excelsa* Leme (1993: 6) (Figura 3) é saxícola, se propaga por brotos basais e pode atingir de 70 a 130 cm de altura quando florida. As folhas são coriáceas, com arranjo em forma de roseta, sendo que cada indivíduo pode formar de 1 a 3 inflorescências ao mesmo tempo com flores alaranjadas (Paggi *et al.*, 2015). *Dyckia excelsa* foi descrita em 1993, baseada em uma coleção particular de Roberto Burle Marx (R. Burle Marx s. n.), a qual florescia em cultivo. Desde então, o primeiro registro sobre a localização natural desta espécie foi feito por Paggi e colaboradores (2015), nas cidades de Corumbá e Ladário (MS), restrito aos afloramentos rochosos ferruginosos do Planalto Residual do Urucum, na fronteira entre Brasil e Bolívia. Há registros da espécie também nas cidades de Bodoquena (MS) (Melo, 2016), na região Sul do Pantanal e na cidade de Cuiabá (MT) (<http://www.splink.org.br/>).



**Figura 3.** A – Agrupamento de indivíduos adultos de *Dyckia excelsa* em fase de frutificação; B – Detalhe da inflorescência com flores alaranjadas e estames amarelos; C – Detalhe do fruto com sementes expostas; D – Indivíduo jovem; E – Grupo de indivíduos adultos em fase de floração. Imagens da autora.

#### I.6. Justificativa

Devido à escassez de conhecimentos sobre aspectos genéticos, biológicos e evolutivos da flora Pantaneira, tais como o estudo da estrutura genética de suas populações, isolamento por distância e fluxo gênico, este estudo teve como objetivo geral contribuir com informações acerca da diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Dyckia excelsa* Leme. Os achados desse estudo irão fornecer informações importantes para a tomada de decisões no desenvolvimento de planos de conservação neste bioma, assim como será um dos primeiros estudos genéticos com populações naturais de plantas do Pantanal.

*Capítulo II*  
*Objetivos*

## **II. Objetivos**

### *II.1. Objetivo geral*

Examinar os níveis de diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Dyckia excelsa* Leme para compreender os padrões contemporâneos e históricos de dispersão das populações desta espécie em afloramentos rochosos ferruginosos (*cangas*) de Corumbá, Mato Grosso do Sul, contribuindo para o estabelecimento de estratégias de conservação de Bromeliaceae

*II.2. Objetivos específicos*

- II.2.1. Descrever a variabilidade genética e estimar a estruturação genética dentro e entre populações de *Dyckia excelsa* Leme, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites nucleares e sequências de DNA de regiões plastidiais;
- II.2.2. Correlacionar os dados de diversidade genética com dados geográficos das diferentes populações para emitir diagnósticos sobre a distribuição da variação genética desta espécie, visando à conservação da mesma;
- II.2.3. Contribuir para o melhor entendimento sobre o sistema de ilhas terrestres, utilizando as *cangas* e esta espécie de bromélia como modelo.

*Capítulo III*

**Strong genetic structure in *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae), an endangered species from ironstone outcrops, Pantanal, Brazil**

Artigo a ser submetido à Plant Ecology & Diversity

**Strong genetic structure in *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae), an endangered species from ironstone outcrops, Pantanal, Brazil**

Renata de Barros Ruas<sup>1</sup>, Gecele Matos Paggi<sup>2</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, Ciências Biológicas, Campus Pantanal, P.O Box 252, 79304-902, Corumbá, MS, Brazil.

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

## **ABSTRACT**

The plant communities associated with iron-rich outcrops - especially those that compose the Pantanal landscape - are still little known relative to genetic aspects. Rock outcrops are often considered as being “terrestrial islands”, and gene flow among populations on different outcrops is presumed to be hampered by the isolation effect provided by the surrounding matrix. Here we studied the genetic diversity and structure of *Dyckia excelsa* populations to test the hypothesis that its genetic variability is highly structured due to the disjunction of ironstone outcrops where this species occurs. Eight nuclear microsatellite markers and two intergenic spacers (*rps16-trnK* and *rpl32 – trnL*) in chloroplast DNA were used to characterize 101 individuals from seven locations in the city of Corumbá, Mato Grosso do Sul state. The species exhibited low haplotype and allelic diversity and high levels of divergence among outcrops, indicating a prolonged genetic isolation, with diversification of haplotypes dating from the Pleistocene (1,4 Mya). Pollen movement, although generally restricted, may occur between neighboring populations, resulting in a pattern of isolation by distance. For conservation purposes, it is recommended that *D. excelsa* should be preserved *in situ* in whatever location, given the low levels of gene flow and the high degree of genetic uniqueness in each population investigated.

## INTRODUCTION

The ironstone outcrops, also known as *cangas*, are ecosystems formed from the weathering product of underlying iron-formation, resulting in ferruginous rocks inert to chemical weathering, forming smooth slopes and plateaus (Dorr II, 1969; Schobbenhaus and Coelho, 1986; Castro, 2008). There are great knowledge gaps regarding plant communities associated with iron-rich outcrops, with regards to floristic or plant ecology (Porto and Silva, 1989; Silva, 1991, Jacobi *et al.*, 2015). In Brazil, these plant communities are associated with large mineral reserves; therefore, the intensity of opencast mining poses an immediate threat to these ecosystems (Ginocchio and Baker, 2004).

The plant communities in the *cangas* represent islands of xeric communities, with ecological conditions that generally differ from the adjacent landscape – or matrix – in which they are imbedded, which are usually rainforests or savannahs (Porembski *et al.*, 1994; Porembski *et al.*, 1998, Jacobi *et al.*, 2015). Since their spatial and ecological isolation, rock outcrops are often considered as being “terrestrial islands” (Porembski, 2007; Burke, 2012). Comparable with oceanic islands, gene flow among conspecific populations on different rock outcrops is presumed to be hampered by the isolation effect provided by the surrounding matrix (Gonçalves *et al.*, 2017). In Brazil, the ironstone outcrops are located in several outstanding world conservation sites, namely the Atlantic Rainforest and Cerrado, which are two of the 34 world biodiversity hotspots (Mittermeier *et al.*, 2004); three of the 37 earth’s last wild places (Mittermeier *et al.*, 2002): Amazon Rainforest, Pantanal and Caatinga; and one of the world centres of plant diversity (Giulietti *et al.*, 1997), the Espinhaco Range.

The Pantanal is one of the largest wetlands in the world, with an area of about 140,000 km<sup>2</sup>. This biome is influenced by four other South American biomes: Amazon rainforest, Cerrado, Chaco, and Atlantic Forest (Adámoli, 1982). The large variety of vegetation and soil types makes the Pantanal one of the most biodiverse biomes in the Neotropics (Nunes da Cunha *et al.* 2006). The beauty of its landscape and its large species diversity are result of its habitat diversity and account for the enormous interest in this area (Nunes da Cunha and Junk, 2011). Despite this, only studies in animals and protozoa (Eizirik *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2006, 2007; Faria *et al.*, 2008; Iervolino *et al.*, 2010; Caramaschi *et al.*, 2011; Fermino *et al.*, 2015; Valdez *et al.*, 2015; Clozato *et al.*, 2017; Miño

(et al., 2010; Okazaki et al., 2017; Mondin et al., 2018; Schön et al., 2018) have been published, focusing on diversity and genetic structure in natural populations in Pantanal. No study on natural plant populations was found for this region.

In South America, plant species belonging to the Bromeliaceae family are among the most important components of rock outcrops vegetation (Porembski, 2007; De Paula et al., 2016). Bromeliads have radiated into extreme environments that range from mesic to xeric, from terrestrial to epiphytic and from sea level to high altitudes. The family is therefore often viewed as a prime example for adaptive radiation (Benzing, 2000). Many members of this family have key adaptations like leaf succulence, herbivore protection through spiny leaves, and crassulacean acid metabolism (CAM) that allow them to inhabit rocky, (semi) arid environments (Benzing, 2000; Givnish et al., 2014; Silvestro et al., 2014).

Population genetics studies can be used to interpret patterns of genetic structure and determine whether terrestrial island populations are isolated or connected (Masta, 2000; Floyd et al., 2005; Byrne and Hopper, 2008; Cooper et al., 2011; Pinheiro et al., 2014). Previous works on bromeliads from rock outcrops in South America surrounded by mesic forest indicated that an extent of genetic structure was often correlated with ecological and geographical factors (Barbará et al., 2007, 2009; Boisselier-Dubayle et al., 2010; Palma-Silva et al., 2011, Gonçalves-Oliveira et al., 2017, Hmeljevski et al., 2017). As expected for terrestrial islands, genetic differentiation between individual rock outcrops was generally strong, suggesting low levels of gene flow.

*Dyckia excelsa* Leme (Figure 1) (Bromeliaceae; subfamily Pitcairnioideae) has a narrow geographical distribution and was recently described occurring on the ironstone outcrops located in the Urucum Residual Plateau (Figure 2), on the border of Brazil and Bolivia, in the Pantanal biome (Paggi et al., 2015). Species of the *Dyckia* genus prefer xeromorphic environments characterized by poor soil, little water supply and high sunlight exposure, such as rocky outcrops (Santos-Silva et al., 2013; Krapp et al., 2014). The restricted geographical distribution may enhance the occurrence of some evolutionary forces as genetic drift, inbreeding and bottleneck, which consequently can lead to low genetic diversity in populations (Gibson et al., 2008; Ravikanth et al., 2010).

To contribute to the understanding of the diversification of plants from Pantanal, we used as a model *Dyckia excelsa* occurring on ironstone outcrops in this biome. For this, we studied seven populations of *D. excelsa*, using eight nuclear microsatellite markers and DNA

---

sequences of two plastid regions, aiming access contemporary and historical process which led to the diversification of the species. The specific aims were (1) to estimate levels of genetic diversity and population differentiation; (2) to correlate the data of genetic diversity with geographic data to issue diagnostics about the distribution of genetic variation of this species, directing its conservation and (3) contribute to a better understanding of the system of terrestrial islands in Pantanal biome. We tested the hypothesis that genetic variability of *D. excelsa* is highly structured due to the typical fragmentation of their habitat. The findings of this study will provide important information for development decisions and conservation planning in this landscape, as will be the first genetic study with natural populations of plants in the Pantanal.

## MATERIAL AND METHODS

### *Study species*

*Dyckia excelsa* is saxicolous and, when in full bloom, can reach from 70 to 130 cm tall. It grows forming dense heliophylous populations on patches of exposed calcareous rock and ironstone outcrops. Each rosette can produce up to three inflorescences at the same time, with simple inflorescences and orange flowers (Figure 1). The conservation status of the species can not yet be defined as there is not enough data for this. However, it should probably be considered as threatened, due to its occurrence in only one large unprotected area at the São João Farm, one small protected area at the Piraputangas Park and other little groups in the Corumbá city (Paggi *et al.*, 2015), one population in the Bodoquena city, southwest of Mato Grosso do Sul and in the city of Cuiabá, Mato Grosso (<http://splink.cria.org.br/>). This study will provide important data to classify the species in relation to its conservation.

### *Population sampling and DNA extraction*

In total, 101 individuals of *D. excelsa* from seven locations were collected covering the entire known occurrence of the species in Corumbá, MS (Figure 2). The collection points are distant from each other from 0.4 km to 19 km. Information on each sampling locality

and the number of individuals from each location used in SSR analyses and DNA sequencing are presented in Table 1. Leaves were collected at a minimum distance of 10m between individuals to avoid sampling clones. Only in Monjolinho Farm, Nova Corumbá and Marina Gatass Park, the 10m distance could not be strictly followed due to the low number of individuals remaining in these sampling sites. Young leaves were collected, cut into small pieces and stored in silica gel for drying. Total genomic DNA was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol, according to Doyle and Dickson (1987).

#### *Microsatellite markers and genotyping assays*

To access more recent population processes, eight nuclear SSR loci described for other bromeliads species were used to genotype 101 individuals from the seven populations: Dd07, Dd10 (*Dyckia distachya* - Zanella *et al.*, 2012); Acom\_12.12, Acom\_71.3, Acom\_82.8 (*Ananas comosus* - Wöhrmann & Weising, 2011); Ac11, Ac25 (*Aechmea caudata* - Goetze *et al.*, 2013) and ngDy\_24 (*Dyckia marnier-lapostollei* var. *estevensis* - Wöhrmann *et al.*, 2012). The polymerase chain reaction (PCR) and genotyping were performed in a Veriti 96-well termal cycler (Applied Biosystems), according to Zanella *et al.* (2012). The microsatellite alleles were resolved on an ABI 3500 DNA analyser sequencer (Applied Biosystems) compared with GS500 LIZ molecular size standard (Applied Biosystems) using GENEMARKER demo version 2.6.2 software (SoftGenetics).

#### *Plastid DNA amplification and sequencing*

The inference of historical processes influencing the genetic and population structure was accessed by the use of two plastid DNA regions (*rpl32-trnL* and *rps16-trnK*). The regions were amplified and sequenced for a subset of 38 individuals from six populations, using the primers described by Shaw *et al.* (2007). All PCRs were carried out in a total volume of 20 µL containing 10 ng DNA template, 1X Taq buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP mix, 10 pmol forward and reverse primers and 2U Taq DNA polymerase (Quatro G). The run parameters were: an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 1 min, 54 °C (*rpl32-trnL*) and 58 °C (*rps16-trnK*) for 1 min, and 72 °C for 1

---

min. There was a final extension for 10 min at 72 °C. PCR amplifications were performed in a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). PCR products were sequenced from both ends using a Big-Dye Kit (Applied Biosystems) by Macrogen Inc. All sequences have been deposited in GenBank under accession numbers XXX.

#### *Data analyses: nuclear SSR loci*

The genetic diversity of *D. excelsa* populations was characterized by the number of alleles (A), number of private alleles ( $A_p$ ), allelic richness ( $R_s$ ), observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity and inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ; Weir and Cockerham, 1984), which were calculated using Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 1995) and MSA 4.00 (Dieringer & Schlötterer, 2003). Departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for each population were identified using exact tests in Genepop on the web (Raymond & Rousset, 1995).

To investigate population structure, a Bayesian analysis implemented in the Structure version 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) was performed. The Structure was run for  $K = 1-10$  with ten replicates each and a model based on admixture and independent allelic frequencies, without taking into account information regarding sampling localities. Each run had 1 000 000 iterations with a burn-in of 200 000. The optimum K value was determined according to the model values ( $\Delta K$ ) based on the second-order rate of change, with respect to K of the likelihood function (Evanno *et al.*, 2005). The calculation of  $\Delta K$  was performed using Structure Harvester version 0.6.94 (Earl and von Holdt, 2012).

The genetic differentiation of populations was assessed by the estimates of  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham, 1984) and the standardized genetic differentiation measure  $G^{\prime}ST$  (Hedrick, 2005) calculated in the software FSTAT (Goudet, 1995). Pairwise comparisons of  $F_{ST}$  between populations were estimated using the software Arlequin 3.11 (Excoffier, *et al.*, 2005). Based on the most appropriate number of clusters suggested by Bayesian clustering, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed with Arlequin, partitioning the genetic diversity within and among populations and among populations within groups (Excoffier *et al.*, 1992). The hypothesis that populations are differentiated because of isolation-by-distance (Wright, 1965) was tested by calculating the correlation between geographical and genetic distance matrices ( $F_{ST}$ ) with a standardized Mantel test using Genepop. The significance was assessed through a randomization test using 10 000 Monte

Carlo simulations. Pairwise effective migration rates ( $N_{em}$ ) were estimated among populations, following a coalescent theory and maximum-likelihood based approach using MIGRATE 3.0.3 software (Beerli and Felsenstein, 1999).

Each population was tested for recent population size reductions (i.e. genetic bottlenecks), using a heterozygosity excess test implemented in the Bottleneck 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999). The analysis was carried out using a two-phased mutation model (TPM), with 12% of variance and 95% of the stepwise mutation model in the TPM. Statistical significance was assessed by 10000 replicates using a one-tailed Wilcoxon signed-rank test.

#### *Data analyses: plastid DNA*

The sequences obtained were checked using Chromas 2.32 (available at <http://technelysium.com.au/>) and aligned using MUSCLE (Edgar, 2004) implemented in MEGA version 7.0 (Tamura *et al.*, 2011). All analyses were conducted using a concatenated set of sequences for the two plastid DNA markers *rpl32-trnL* and *rps16-trnK*.

To characterize genetic diversity, haplotype ( $h$ ) and nucleotide ( $\pi$ ) diversities (Nei, 1987) were estimated for each population using Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Haplotypes were identified using DnaSP and the evolutionary relationships among them were estimated with Network 4.6.1.1 (available at <http://www.fluxus-engineering.com>) using the median-joining (MJ) method (Bandelt *et al.*, 1999). Estimates of differentiation ( $G_{ST}$  and  $F_{ST}$  statistics) were calculated in the software DnaSP. An AMOVA was performed to examine the partition of genetic diversity within and among populations in Arlequin.

BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure) was used to infer the genetic structure. BAPS treats both K and allele frequencies as random variables, and returns one optimal partitioning and the probability of the optimal K. In order to strengthen the inferences, the geographic coordinates of the sampled individuals were used as prior. Spatial clustering and admixture of individuals based on mixture clustering were calculated using a vector of values of K from 1 to 7 and 10 replicates. The admixture analysis was then applied to estimate individual admixture proportions with regards to the most likely number of K clusters identified (Corander and Marttinen, 2006; Corander *et al.*, 2008). Admixture inference was based on 100 iterations using different allele frequencies. BAPS infers the most likely number of gene pools in the sample population and then performs the most likely

---

admixture of genotypes (Corander *et al.* 2004). This approach has more power in identifying hidden structure within populations (Corander and Marttinen 2006).

The population expansion hypothesis was tested through neutrality tests, using Tajima's D (Tajima, 1989), considering the segregating .sites and Fu's Fs (Fu, 1997), based on the haplotype distribution. Tests were carried out with 10 000 simulation steps using the software Arlequin.

The time of cpDNA haplotype divergence was estimated using a Bayesian approach implemented in BEAST version 1.7.5, using *Fosterella albicans* (Grisebach) L.B.Smith (GenBank accession numbers: KF784205 for rpl32-trnL and KF784329 for rps16-trnK) as outgroup. Priors used included the Yule speciation model, the HKY nucleotide substitution model, and the lognormal relaxed clock (uncorrelated) with a substitution rate previously estimated for cpDNA in subfamily Bromelioideae ( $7.64 \times 10^{-4} \pm 4.5 \times 10^{-6}$ ; D. Silvestro, University of Gothenburg, personal communication). Markov chains were run for 15,000,000 steps, sampling every 1000 steps. The results were viewed in Tracer to check for convergence to a stationary distribution and for an effective sample size (ESS) >200 (Drummond and Rambaut, 2007). TreeAnnotator 1.7.5, part of the BEAST package, was used to summarize the trees, and the statistical support for all branches was measured in Bayesian posterior probabilities (PP). FigTree 1.3.1 was used to draw the tree (Rambaut, 2008).

## RESULTS

### *SSR analyses*

Low levels of genetic variation were found in *D. excelsa* populations genotyped with the eight nuclear SSR loci (Table 2). The number of alleles ranged from 10 to 16 and the allelic richness ranged from 1 to 1.87. Observed and expected heterozygosity per population ranged from 0 to 0.238 and from 0 to 0.241, respectively. The number of private alleles varied from zero to 5 per population. The inbreeding coefficients ranged from 0.2 to 0.625 and only the population PP presented a deviation from HWE (Table 2).

Bayesian analysis of the nuclear SSR data set strongly suggested the presence of three clusters ( $K = 3$ , Figure S1), with only little admixture on the individual level. The assignment

proportion ( $Q$ ) of each individual into each group is shown in Fig. 3A. Cluster I comprised the two populations from the southern part of the Urucum Residual Plateau (MO and PP), whereas cluster II contained the central and the biggest population, SJ. Finally, cluster III included the populations from the urban area of Corumbá, in the northern distribution: BR, AV, NC and MG.

High levels of genetic differentiation across populations were found, considering  $F_{ST}$  (0.437) and  $G'_{ST}$  (0.425). The pairwise  $F_{ST}$  values also revealed high genetic structure, in most cases, increasing the value as the distance between populations increases (Table 3). These values were generally higher for populations from different clusters than for populations from the same cluster. AMOVA results indicated that the highest proportion of genetic variation was found within populations (54.61%), indicating a genetic differentiation mostly among individuals (Table 4). Nevertheless, a considerable amount of 25.72% of the total variation occurred among the three groups revealed by structure, and 19.68% were attributable to variation among populations within groups (Table 4). A significant correlation among genetic and geographical distances was detected by the Mantel test ( $r^2 = 0.2926$ ,  $p < 0.05$ ), indicating the presence of isolation by distance among collecting sites (Figure 4). Values of migration rates among populations were very low (Table 5), corroborating the strong genetic structure revealed from previous analyses (AMOVA and Bayesian clustering). No excess of heterozygosity was detected in the bottleneck analysis for any of the four populations investigated with microsatellite loci, suggesting no changes in population sizes.

#### *Plastid DNA analysis*

Concatenated sequences of the *rpl32-trnL* and *rps16-trnK* intergenic spacers of plastid DNA totalized 1577 base pairs (bp). A total of three polymorphic sites (one transition, one transversion, and one indel) were observed. Three haplotypes were found in the 38 individuals analyzed for the six populations. The nucleotide composition of plastid DNA exhibited 28.64% of CG. The haplotype diversity ( $h$ ) for all populations totalized 0.5676 and nucleotide diversity ( $\pi$ ) was 0.000866 (Table 2). All populations presented only one haplotype each (Table 2). Four of the six populations showed the haplotype H3 (Figure 3C, Table 2). The haplotype network (Figure 3C) showed the low haplotypic diversity, with one

unique haplotype occurring in each geographic region. In addition, the haplotypes distribution found coincides with the clustering in Bayesian analysis of the microsatellite loci.

Genetic differentiation between populations was high, with  $F_{ST}$  and  $G_{ST} = 1.00$ . When the populations were grouped into groups (as indicated by the Bayesian clustering described below), the AMOVA results showed that 100% of the variation is observed among groups of populations ( $P = 0.065$ ). The results of the Tajima's  $D$  (2.032) and Fu's  $F_S$  (2.780) neutrality tests were not significant, indicating demographic stability.

According to the BAPS spatial analysis, the plastid DNA is optimally partitioned into three genetically structured groups (Figure 3B). The Bayesian analysis identified one genetic group occurring in the populations from the northern geographical distribution of *D. excelsa* (MG, NC, AV and BR), whereas distinct genetic clusters were found for the SJ and PP, like the Bayesian analysis in the nuclear data set. The time of divergence of the *D. excelsa* haplotypes was estimated to be c. 1.4 Mya (95% highest posterior density: 0.15–4.59 Mya) (Figure 5).

## DISCUSSION

### *Genetic diversity, contemporary population structure and gene flow*

Overall genetic diversity parameters across *D. excelsa* populations showed to be low in terms of nuclear data (Table 2). This result is in accordance with previous findings for other narrow endemic *Dyckia* species, i.e., *D. grandidentata* Braun, P.J & E, *D. pottiorum* Leme, *D. divaricata* Leme & H. Büneker, *D. exserta* L.B.Sm (Melo, 2016) and *D. brevifolia* Baker (Rogalski *et al.*, 2017). Narrow endemic species, in general, are more vulnerable to drift and have limited gene flow, reducing intrapopulation genetic variability (Loveless and Hamrick, 1984; Gibson *et al.*, 2008). In general, species with restricted distribution have lower genetic diversity comparing to widespread species (Gibson *et al.*, 2008). As a best example, *D. leptostachya*, a species of wide distribution, occurs in sympatry with some *D. excelsa* populations and presents higher levels of genetic diversity (Brandão, 2016). However, not all restricted species have low genetic diversity, including some Bromeliaceae (Goetze *et al.*, 2015, Turchetto *et al.*, 2016, Soares *et al.*, *in press*). Indeed, rates of genetic

diversity may be related to many other factors such as reproductive system, effective number of individuals, founder effect, species life-history and ecological traits (Frankham *et al.*, 2002, Eliades *et al.*, 2011).

*Dyckia excelsa* presents clonal reproduction and is self-incompatible (Lenzi and Paggi, *in press*). Self-incompatible plants are obligate outbreeders because they can use only outcross pollen (from other individuals) to produce seeds, thus they present high pollinator dependence for sexual reproduction (Richards, 1997). Also, mate availability is a critical factor in self-incompatible species, and the effects of its reduction have been linked to low genetic diversity, especially when combined with clonal reproduction (Jacquemyn and Honnay, 2008). In addition, the ability of self-incompatible species to maintain mating-allele diversity is limited in small populations, and genome-wide diversity falls even more rapidly (Byers and Meagher, 1992; Navascués *et al.*, 2010).

Despite the low diversity within populations (see Rs and Ho, Table 2), only one of them was not in HWE. This is probably due to the obligatory cross-fertilization and the efficiency of pollinators within each population. Mating influences the movement of genes in space and their transmission through time. Plant mating systems can be influenced by intrinsic factors, such as floral morphology and self-compatibility, and by extrinsic factors, such as pollinator mobility and foraging behavior (Krauss *et al.*, 2017). The pollinator behavior and mobility of floral visitors are key factors in maintaining genetic diversity within and between populations (Jakobsson *et al.*, 2015; Krauss *et al.*, 2017). Early studies on reproductive biology of *D. excelsa* revealed that the species may have several pollinators, including insects (Hymenoptera and Lepidoptera) and birds (hummingbirds) (Lenzi and Paggi, *in press*). This strategy may be important in increasing the possibility of mating within the population and ensuring obligatory cross-pollination of the species (Krauss *et al.*, 2017). AMOVA results also show the highest proportion of genetic variation within populations, which corroborates the maintenance of diversity and the equilibrium found within the populations.

In general, our results showed highly differentiated populations (Figure 3a, Table 3), suggesting that pollen dispersal among *cangas* patches is limited. Low levels of pollen flow were identified in another bromeliads occurring in rocky outcrops, as *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata* (Barbará *et al.*, 2007), *Pitcairnia geyskesii* (Boisselier-Dubayle *et al.*, 2010), *Pitcairnia albiflos* and *P. staminea* (Palma-Silva *et al.*, 2011), *Encholirium spectabile*

---

(Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2017) and *Encholirium horridum* (Hmellevski *et al.*, 2017). Similar observations were also made for other plant species growing on rock outcrops, such as *Vellozia compacta* (Velloziaceae) in southeastern Brazil (Lousada *et al.*, 2013) and *Grevillea georgeana* (Proteaceae) in Australia (Nistelberger *et al.*, 2015). The three groups found in the Bayesian analysis may correspond to terrestrial islands. We can speculate that the high elevation of the Urucum Residual Plateau (Figure 2) is a geographic barrier that has contributed to the genetic distinctness between the populations PP and SJ, besides the adjacent forest. The populations MO and PP may correspond a large island because they are not separated by a dense forest, allowing some connectivity through the movement via pollen (also shown in the number of effective migrants –  $N_e m = 3.807$  from PP to MO; Figure 3). In northern populations (BR, AV, NC and MG), the genetic proximity between these nearby populations may have contributed to the small pattern of isolation by distance observed by the Mantel test (Figure 4). In hospitable habitat can influence significantly narrow endemic plants, concerning lower colonization ability and investment in pollen transfer and seed production (Lavergne *et al.*, 2004). *Dyckia* species are characterized by occurring in xeromorphic and inhospitable habitats (Santos-Silva *et al.*, 2013), having seed and pollen dispersal mediated by wind, insects and hummingbirds respectively, which, according to the results obtained here, are not reaching long distances (Pereira *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009, Lenzi and Paggi *in press*), decreasing gene flow among populations. More work is needed on reproductive biology and pollination to better understand this dynamics in *D. excelsa*. Still, the isolation provided by the adjacent matrix disconnects the three large groups with a landscape completely different in edaphic and microclimatic conditions, confirming our hypotheses of terrestrial islands shaping the genetic variation in *D. excelsa*.

### *Historical patterns*

Populations of *D. excelsa* show genetic signals of high differentiation and low haplotype diversity (Figure 3c, Table 2) that are indicative of prolonged isolation on ironstone outcrops. Moreover, in bromeliads, the low sequence variation in plastid DNA has been previously detected in other studies (Barfuss *et al.*, 2005; Horres *et al.*, 2007; Schulte *et al.*, 2009; Versieux *et al.*, 2012) with divergence levels about three times lower than that observed for other families (Maia *et al.*, 2012). The extremely high population differentiation

---

observed in the nuclear and plastid data suggests that pollen and seed dispersal among groups is limited and that long-term isolation has allowed independent processes of mutation and genetic drift in these populations (Byrne and Hopper, 2008; Pinheiro *et al.*, 2014). Studies have highlighted the role of isolation and subsequent genetic drift on the evolution of populations in terrestrial islands (Sarthou *et al.*, 2001; Barbará *et al.*, 2007; Byrne and Hopper, 2008; Pinheiro *et al.*, 2014; Tapper *et al.*, 2014a, b).

Molecular dating estimates have indicated that the divergence of haplotypes, between the groups occurred during the Pleistocene (1.4 Mya – Figure 5). The Pantanal's geomorphology is the product of climatic fluctuations and environmental changes that have been occurring in this epoch (Assine and Soares, 2004). After a period dominated by arid conditions in the Late Pleistocene, the Pantanal area experienced an episode of humidification in the Early Holocene. The highlands as the Urucum Residual Plateau limiting the floodplains suggests recent large-scale tectonic activity, which possibly caused these terrains to uplift and surrounding areas to subside, forming the Pantanal Basin. These process promoted important modifications in the landscape in the last several thousand years (Warren *et al.*, 2015) and may be responsible for the divergence of the haplotypes in *D. excelsa*. Glacial periods in tropical zones were characterized by drier climatic conditions, favoring the expansion of open vegetation types such as savannas and outcrop vegetation (Boisselier-Dubayle *et al.*, 2010). This pattern was not observed in *D. excelsa*, which did not show demographic fluctuations in the neutrality test and no reduction in population size through the bottleneck test. It appears that this species persisted in small populations, with possible localized contraction and expansion within outcrops. This isolation on multiple outcrops through a period of considerable climatic turbulence indicates that most outcrops provide refugial opportunities to facilitate persistence of populations (Tapper *et al.*, 2014).

Populations of species with patchy or discontinuous distributions, such as those on islands, may experience pronounced genetic isolation leading to patterns of deep genetic divergence among populations (Sarthou *et al.*, 2001; Beheregaray *et al.*, 2003; Juan *et al.*, 2004; Barbará *et al.*, 2007; Measey *et al.*, 2007; Zhai *et al.*, 2012). Thus, rock outcrops could be highly useful venues for studies regarding the molecular ecology and genetics of continental radiations (Zanella *et al.*, 2012).

### *Conservation*

---

For conservation purposes, it is recommended that *D. excelsa* should be preserved *in situ* in whatever location, given the low levels of gene flow and the high degree of genetic uniqueness in each population investigated. Each region apparently preserves its own gene pool that might not even be available in geographically close areas. Except for one population, all other groups are in unprotected areas (farms and urban areas), which make their conservation challenging due to habitat loss in these locations. The populations in urban areas may not be underestimated regarding its importance to conserving gene pools, and are subjected to the risks of degradation, fire and vandalism, as well as the populations in the farms may suffer from the deforestation for different purposes. In addition, the outcrops may be important localized refugia for impending anthropogenic climate change (Tapper *et al.*, 2014).

Recently, other species of *Dyckia* were also described and identified as endemic from rocky outcrops of the Mato Grosso do Sul state (Versieux *et al.* in press). Probably, the peculiar environmental setting together with geographic isolation and the age of *cangas* have contributed to the evolution of species with distribution restricted to one or few sites, showing the great importance of the region for conservation issues (Paggi *et al.*, 2015).

## REFERENCES

- Assine ML, Soares PC (2004) Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quat Int* 114(1):23–34.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol Ecol* 16:1981–1992.

Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S, Lexer C (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). Ann Bot 103:65–77.

Barfuss MHJ, Samuel R, Till W, Stuessy TF (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. Am J Bot 92: 337–351.

Beerli, P, Felsenstein J (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. Genetics 152:763-773.

Beheregaray LB, Ciofi C, Caccone A, Gibbs JP, Powell JR (2003) Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzon, Galapagos islands. Conserv Genet 4: 31–46.

Benzing DH (2000) Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 710 pp.

Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C (2010) Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana - A test of the forest refuge hypothesis. Ecography 33:175–184.

Brandão BB (2016) Conservação, diversidade e estrutura genética de populações de *Dyckia leptostachya* Baker (Bromeliaceae). Dissertation. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Burke A (2012) The effect of altitude on arid inselbergs along a bioclimatic gradient. J Nat Hist 46:3011–3023.

Byers DL, Meagher TR (1992) Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity* 68:353–359.

Byrne M, Hopper S (2008) Granite outcrops as ancient islands in old landscapes: evidence from the phylogeography and population genetics of *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae) in Western Australia. *Biol J Linn Soc Lond* 93: 177–188.

Caramaschi FP, Nascimento FF, Cerqueira R, Bonvicino CR (2011) Genetic diversity of wild populations of the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica* (Didelphimorphia: Didelphidae), in Brazilian landscapes. *Biol J Linn Soc Lond* 104: 251–263.

Carmo FF, Jacobi CM (2013) A vegetação de *canga* no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. *Rodriguésia* 64(3): 527–541.

Castro PTA (2008) *Cangas*: a influência da geodiversidade na biodiversidade. In: Jacobi CM, Stehman JR, Antonini Y, Carmo FF, Oliveira-Neves AC, Mourão FA, Silva, ES (org) I Simpósio: afloramentos ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero: biodiversidade, conservação e perspectivas de sustentabilidade. UFMG/ICB, Belo Horizonte, pp 30–51.

Charpentier A (2002) Consequences of clonal growth for plant mating. *Evol Ecol* 15:521–30.

Clozato CL, Miranda FR, Lara-Ruiz P, Collevatti RG and Santos FR (2017) Population structure and genetic diversity of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*: Myrmecophagidae, pilosa) in Brazil. *Genet Mol Biol* 40:50–60.

Cooper SJB, Harvey MS, Saint KM, Main BY (2011) Deep phylogeographic structuring of populations of the trapdoor spider *Moggridgea tingle* (Migidae) from southwestern Australia: evidence for long-term refugia within refugia. *Mol Ecol* 20: 3219–3236.

- Corander J, Waldmann P, Marttinen P, Sillanpää MJ (2004) BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20:2363–2369.
- Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Mol Ecol* 15: 2833–2843.
- 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.
- De Paula LFA, Forzza RC, Neri AV, Bueno MI, Porembski S (2016) Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: A centre of diversity for mat-forming bromeliads on inselbergs. *Bot J Linn Soc* 181:459–476.
- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3:167–169.
- Dorr II JVN (1969) Physiographic, stratigraphic and structural development of Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. United States Geological Survey. Prof. Paper, 641-A. Washington. 110 pp.
- Doyle JJ, Dickson EE (1987) Preservation of Plant Samples for DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Taxon* 36: 715-722.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Duarte EF, Carneiro IF, Rezende MH (2009) Morfologia de Frutos e Sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae). *Rev Biol Neotrop* 6(1): 1–12.
- Earl DA, von Holdt BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4: 359–361.

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.

Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG, O'Brien SJ and Johnson WE (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Mol Ecol* 10:65–79.

Eliades NGH, Gailing O, Leinemann L, Fady B, Finkeldey R (2011) High genetic diversity and significant population structure in *Cedrus brevifolia* Henry, a narrow endemic Mediterranean tree from Cyprus. *Plant Syst Evol* 4: 185-198.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the numbers of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611–2620.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47–50.

Faria PJ, Guedes NMR, Yamashita C, Martuscelli P and Miyaki CY (2008) Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*): Implications for conservation. *Biodivers Conserv* 17:765–779.

Fermino BR, Paiva F, Soares P, Tavares LER, Viola LB, Ferreira RC, Botero-Arias R, de-Paula CD, Campaner M, Takata CSA *et al.* (2015) Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 4: 368-378.

- Floyd CH, Van Vuren DH, May B (2005) Marmots on Great Basin mountaintops: using genetics to test a biogeographic paradigm. *Ecology* 86: 2145–2153.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, New York, 617p.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- 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). *Am J Bot* 95(5):588–596.
- Ginocchio R, Baker AJM (2004) Metallophytes in Latin America: a remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. *Rev Chil Hist Nat* 77:185–194.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith AC *et al.* (2014) Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol Phylogenet Evol* 71:55–78.
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata*(Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochem Syst Ecol* 48:194–198.
- Goetze M, Büttow MV, Zanella CM, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro FG, Sampaio JAT, PalmaSilva C, Cidade FW, Bered F (2015) Genetic Variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochem Syst Ecol* 58: 204–210.

Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Krapp F, Alves M, Wanderley MGL, Weising K (2017) Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. Am J Bot 104 (6): 1–11.

Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. J Hered 86: 485–486.

Handel SN (1985) The intrusion of clonal growth patterns on plant breeding systems. Am Nat 125:367-83.

Hedrick P (2005) A standardized genetic differentiation measure. Ecology 59:1633–1638.

Hmeljevski KV, Nazareno AG, Bueno ML, Reis MS, Forzza RC (2017) Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. Ecol Evol 7(13):4704–4716.

Horres R, Schulte K, Weising K, Zizka G (2007) Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – evidence from molecular and anatomical studies. Aiso 23:27–43.

Iervolino F, de Resende EK and Hilsdorf AWS (2010) The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. Fish Res 101:27–31.

Jacobi CM, Carmo FF, Carmo FF, Campos IC (2015) Iron geosystems: priority areas for conservation in Brazil. In: Tibett M (eds) Mining in ecologically sensitive landscapes. CSIRO Publishing, pp 55 – 78.

Jacquemyn H, Honnay O (2008) Mating system evolution under strong clonality: towards self-compatibility or self-incompatibility? Evol Ecol 22: 483–486.

Jakobsson A, Padrón B, Ågren J (2015) Distance-dependent effects of invasive *Lupinus polyphyllus* on pollination and reproductive success of two native herbs. Basic Appl Ecol 16: 120-127.

Juan A, Crespo MB, Cowan RS, Lexer C, Fay MF (2004) Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). Mol Ecol 13: 2679–2690.

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 Syst Evol 300:1591–1614.

Krauss SL, Phillips RD, Karron JD, Johnson SD, Roberts DG, Hopper SD (2017) Novel consequences of bird pollination for plant mating. Trends Plant Sci 22:395-410.

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.

Lenzi M, Paggi GM (*in press*) Reproductive biology in the bromeliad *Dyckia excelsa*: a xerophyte species from the Pantanal region, Center West of Brazil.

Lopes IF, Brito RA, Henrique-Silva F, Del Lama SN (2006) Demographic history of wood stork (*Mycteria americana*) Brazilian Pantanal colonies revealed by mitochondrial DNA analysis. Genet Mol Biol 29: 241-250.

Lopes IF, Miño CI, Del Lama (2007) Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. Braz J Biol 67: 849-857.

Lousada JM, Lovato MB, Borba EL (2013) High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae)

occurring in two edaphic environments of Brazilian *campos rupestres*. *Braz J Bot* 36(1):45–53.

Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu Rev Ecol Syst* 15: 65–95.

Maia VH, Mata CZ, Franco LO, Cardoso MA, Cardoso SRS, Hermerly AS, Ferreira PCG (2012) DNA barcoding Bromeliaceae: achievements and pitfalls. *PLoS ONE* 7:e29877.

Márquez A, Maldonado JE, González S, Beccaceci MD, Garcia JE, Duarte JMB (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conserv Genet* 7: 563–575.

Masta SE (2000) Phylogeography of the jumping spider *Habronattus pugillis* (Araneae: Salticidae): recent vicariance of sky island populations? *Evolution* 54: 1699–1711.

Measey GJ, Vences M, Drewes RC, Chiari Y, Melo M, Bourles B (2007) Freshwater paths across the ocean: molecular phylogeny of the frog *Ptychadena newtoni* gives insights into amphibian colonization of oceanic islands. *J Biogeogr* 34: 7–20.

Melo CA (2016) Filogeografia de cinco espécies de *Dyckia* (Bromeliaceae) endêmicas de uma região do centro-oeste brasileiro, que compreende os biomas Cerrado, Pantanal e Chaco, em comparação com uma congênere amplamente distribuída (Dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Miño CI, Avelar LH d. S, da Silva FM, Perez MF, Menezes LF and Del Lama SN (2017) Genetic differentiation and historical demography of wood stork populations in Brazilian wetlands: Implications for the conservation of the species and associated ecosystems. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 27:1313–1324. doi: 10.1002/aqc.2791

Mondin LAC, Machado CB, de Resende EK, Marques DKS and Galetti PM (2018) Genetic pattern and demographic history of *Salminus brasiliensis*: Population expansion in the pantanal region during the Pleistocene. *Front Genet.*

Navascues M, Stoeckel S, Mariette S (2010) Genetic diversity and fitness in small populations of partially asexual, self-incompatible plants. *Heredity* 104:482–492

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, New York, USA, 512 pp.

Nistelberger HM, Byrne M, Coates D, Roberts JD (2015) Genetic drift drives evolution in the bird-pollinated, terrestrial island endemic *Grevillea georgeana* (Proteaceae). *Bot J Linn Soc* 178: 155–168.

Nunes da Cunha C, Junk WJ (2011) A preliminary classification of habitats of the Pantanal of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, and its relation to national and international wetland classification systems. In: Junk WJ, Silva CJ, Nunes da Cunha C e Watzen KM (eds) The Pantanal: Ecology, biodiversity and sustainable management of a large neotropical seasonal wetland. Pensoft Publishers, Moscou, pp 127–141.

Okazaki TI, Hallerman EM, de Resende EK and Hilsdorf AWS (2017) Genetic characterization of *Brycon hilarii* (Characiformes) populations within the Pantanal: Aspects of their conservation within a globally important neotropical wetland. *J Ichthyol* 57:434–444.

Paggi GM, Louzada RB, Ishii IH, Takahasi A, Arruda RCO, Lorens-Lemke AP (2015) Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: Taxonomy, Geographic Distribution, and Notes on Leaf Anatomy. *Syst Bot* 40:129–135.

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. Mol Ecol 20:3185–3201.

Pereira AR, Pereira TS, Rodrigues AS, Andrade ACS (2008) Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. Acta Bot Brasilica 22 (4):1150–1162.

Pinheiro F, Cozzolino S, Draper D, De Barros F, Félix LP, Fay MF, Palma-Silva C (2014) Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. BMC Evol Biol 14: 49.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. J Hered 90: 502–503.

Porembski S, Martinelli R, Ohlemüller R, Barthlott W (1994) Vegetation of rock outcrops in Guinea: granite inselbergs, sandstone table mountains, and ferricretes – remarks on species numbers and endemism. Flora 189:315–326.

Porembski S, Martinelli R, Ohlemüller R, Barthlott W (1998) Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. Divers Distrib 4:107–119

Porembski S (2007) Tropical inselbergs: Habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. Rev Bras Bot 30:579–586

Porto ML, Silva MFF (1989) Tipos de vegetação metalófila em áreas da Serra de Carajás e de Minas Gerais. Acta Bot Brasilica 3:13–21.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.

Rambaut A (2008) FigTree v1.4: tree figure drawing tool. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

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? *G3 (Bethesda)* (Special Issue 1):22-27.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249.

Richards AJ. 1997. Plant breeding systems. London: Chapman & Hall. 529 p.

Rogalski JM, Reis A, Rogalski M, Montagna T, Reis MS (2017) Mating system and genetic structure across all known populations of *Dyckia brevifolia*: a clonal, endemic, and endangered rheophyte Bromeliad. *J Hered* 108:299–307.

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.

Sarthou C, Samadi S, Boisselier-Dubayle MC (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *Am J Bot* 88:861–868.

Schobbenhaus C, Coelho CES (1986) Principais depósitos minerais do Brasil: ferro e metais da indústria do aço. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasília. 501pp.

Schön I, Higuti J, Patel T, Martens K (2018) Aquatic long-distance dispersal and vicariance shape the evolution of an ostracod species complex (Crustacea) in four major Brazilian floodplains. *Mol Phylogenet Evol* 121:86-97.

Schulte K, Barfuss MHJ, Zizka G (2009) Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveal the evolution of the tank habit within the subfamily. Mol Phylogen Evol 51: 327–339.

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. Am J Bot 94: 275–288.

Silva MFF (1991) Análise Xorística da vegetação que se cresce sobre *canga* hematítica em Carajás, PA (Brasil). Bol Mus Para Emílio Goeldi – Ser Bot 7:79–108.

Silvestro D, Zizka G, Schulte K (2014) Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). Evolution 68:163–175.

Soares LE, Goetze M, Zanella CM, Bered F (2018) Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. Genet Mol Biol 41(1): 308-317.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123:585–595.

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. Mol Biol Evol 28: 2731–2739.

Tapper SL, Byrne M, Yates CJ, Keppel G, Hopper SD, Van Niel K, Schut AGT, Mucina L, Wardell-Johnson GW (2014) Isolated with persistence or dynamically connected? Genetic patterns in a common granite outcrop endemic. Diversity Distrib 20: 1–15.

Turchetto C, Segatto ALA, Mader G, Rodrigues DM, Bonatto SL, Freitas, LB (2016) High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: implications for conservation. AoB PLANTS 8: plw002.

Valdez FP, Haag T, Azevedo FCC, Silveira L, Cavalcanti SMC, Salzano FM and Eizirik E (2015) Population Genetics of Jaguars (*Panthera onca*) in the Brazilian Pantanal: Molecular Evidence for Demographic Connectivity on a Regional Scale. *J Hered.* pp 503–511.

Versieux L, Barbara T, Wanderley MGL, Calvente A, Fay MF, Lexer C (2012) Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. *Mol Phylogenet Evol* 64: 177–189.

Versieux LM, Coffani-Nunes JV, Paggi GM, Costa AF (*in press*) Checklist das Bromeliaceae do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Botânica*.

Warren LV, Quaglio F, Simões MG, Freitas BT, Assine ML, Riccomini C (2015) Underneath the Pantanal Wetland: A deep-time history of Gondwana assembly, climate change, and the dawn of Metazoan life. In: Bergier I and Assine ML (eds) *Dynamics of the Pantanal Wetland in South America*. 1<sup>st</sup> edition. Springer International Publishing, pp 1 – 24.

Weir BS and Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.

Wörhmann T, Weising K (2011) In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor Appl Genet* 123:635–647.

Wörhmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K (2012) Development of 15 nuclear microsatellite markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 5: 81-84.

Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to system of mating. *Evolution* 19: 395–420.

Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis MS and Bered F (2012) Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in others bromeliads. *Int J Mol Sci* 13: 15859–15866.

Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Katchuck-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F (2012) Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genet Mol Biol* 35:1020–1026.

Zhai SN, Comes HP, Nakamura K, Yan HF, Qiu YX (2012) Late Pleistocene lineage divergence among populations of *Neolitsea sericea* (Lauraceae) across a deep sea-barrier in the Ryukyu islands. *J Biogeog* 39: 1347–1360.

**Table 1.** Details of sampling locations and populations sample sizes of *Dyckia excelsa*.

Population name	Population code	Geographical coordinates	Sample size	
			SSR	Plastid DNA
<b>Monjolinho Farm</b>	MO	19° 16' S, 57° 31' W	7	-
<b>Piraputangas Park</b>	PP	19°16' S, 57°37' W	33	6
<b>São João Farm</b>	SJ	19° 10' S, 57° 32' W	25	9
<b>BR 262</b>	BR	19° 04' S, 57° 37' W	11	8
<b>Anel Viário</b>	AV	19° 02' S, 57° 39' W	7	3
<b>Nova Corumbá</b>	NC	19° 01' S, 57° 39' W	12	7
<b>Marina Gatass Park</b>	MG	19° 00' S, 57° 41' W	6	5
			Total	101
				38

**Table 2.** Characterization of genetic variability in seven populations of *Dyckia excelsa* in Pantanal wetland, Mato Grosso do Sul, Brazil, including: number of alleles (A), number of private alleles ( $A_p$ ), allelic richness ( $R_s$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ), inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ), haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ). \*Significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) at the  $P < 0.001$  level.

<b>Population code</b>	<b>SSR</b>							<b>cpDNA</b>	
	<b>A</b>	<b><math>A_p</math></b>	<b><math>R_s</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b>Haplotypes</b>	<b><math>h</math></b>	<b><math>\pi</math></b>
<b>MO</b>	10	0	1	0	0	0.2	-	-	-
<b>PP</b>	16	1	1.56	0.03	0.163	0.551*	H1	0	0
<b>SJ</b>	16	5	1.87	0.238	0.241	0.086	H2	0	0
<b>BR</b>	16	1	1.69	0.212	0.201	0.126	H3	0	0
<b>AV</b>	12	0	1.35	0	0.071	0.319	H3	0	0
<b>NC</b>	16	1	1.67	0.041	0.159	0.467	H3	0	0
<b>MG</b>	12	2	1	0	0	0.625	H3	0	0
<i>Overall mean</i>	14	1.42	1.44	0.074	0.119	0.339	<i>Total species</i>		0.5676 0.000866

**Table 3.** Pairwise  $F_{ST}$  among populations of *Dyckia excelsa* based on eight microsatellite nuclear loci.

Population	MO	PP	SJ	BR	AV	NC
<b>PP</b>	0.044					
<b>SJ</b>	0.163*	0.319*				
<b>BR</b>	0.439*	0.485*	0.328*			
<b>AV</b>	0.532*	0.552*	0.464*	0.254*		
<b>NC</b>	0.585*	0.593*	0.498*	0.131*	0.370*	
<b>MG</b>	0.543*	0.532*	0.425*	0.274*	0.314*	0.538*

\*  $P < 0.05$

**Table 4.** Analysis of molecular variance (AMOVA) for eight nuclear microsatellites in populations of *Dyckia excelsa*. The groups revealed by a Bayesian STRUCTURE analysis ( $K = 3$ ) were considered.

<b>Source of variation</b>	<b>Variation (%)</b>	<b>F-statistic</b>	<b>P</b>
Among groups	25.72	$F_{CT} = 0.257$	0.04554
Among populations within groups	19.68	$F_{ST} = 0.453$	0.000
Within populations	54.61	$F_{SC} = 0.264$	0.000

**Table 5.** Migration rates (number of effective migrants,  $N_e m$ ) derived from the program MIGRATE. Results are given as the effective number of migrants from each population group (as indicated in the first column) into the other populations (as indicated in the first row).

	<b>MO</b>	<b>PP</b>	<b>SJ</b>	<b>BR</b>	<b>AV</b>	<b>NC</b>	<b>MG</b>
<b>MO</b>	0	0.213	0.196	0.819	0.198	0.022	
<b>PP</b>	3.807	0.134	0.643	1.159	0.265	0.521	
<b>SJ</b>	0.073	0.454	0.059	0.142	0.021	0.191	
<b>BR</b>	0.247	0.078	0	0.475	0.434	0.587	
<b>AV</b>	0.556	0.016	0.064	0.206	0.021	1.155	
<b>NC</b>	0.278	0.074	0.152	0.306	0.611		0.088
<b>MG</b>	0.28	0.004	0.011	0.007	0.011	0.064	

### Figure legends

**Figure 1.** Specimens of *Dyckia excelsa* in their habitat. (A) Group of individuals from Monjolinho Farm, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil. (B) Inflorescence details (Images: R. Ruas).

**Figure 2.** Location of the *Dyckia excelsa* populations in Corumbá and Ladário cities, Mato Grosso do Sul, Brazil.

**Figure 3.** STRUCTURE (A) and BAPS (B) analyses of populations *Dyckia excelsa* using Bayesian assignment for (A) a  $K = 3$  population model based on 8 nuclear SSR loci, (B) a  $K = 3$  population model indicated by spatial clustering, based on plastid DNA. (C) Map showing the sampled populations and the respective network for the plastid marker. Pie charts reflect the frequency of occurrence of each plastid DNA haplotype in each population. Haplotype colors correspond to those in the network. In the network, the haplotype frequencies are proportional to circle sizes. More than one mutational step between haplotypes is shown by crossed lines.

**Figure 4.** Relationship between genetic divergence, based on Nei's (1978) unbiased distance for nuclear microsatellites, and geographical distances (km) among 7 populations of *Dyckia excelsa* (Mantel test correlation:  $r^2 = 0.2926$ ;  $p < 0.05$ )

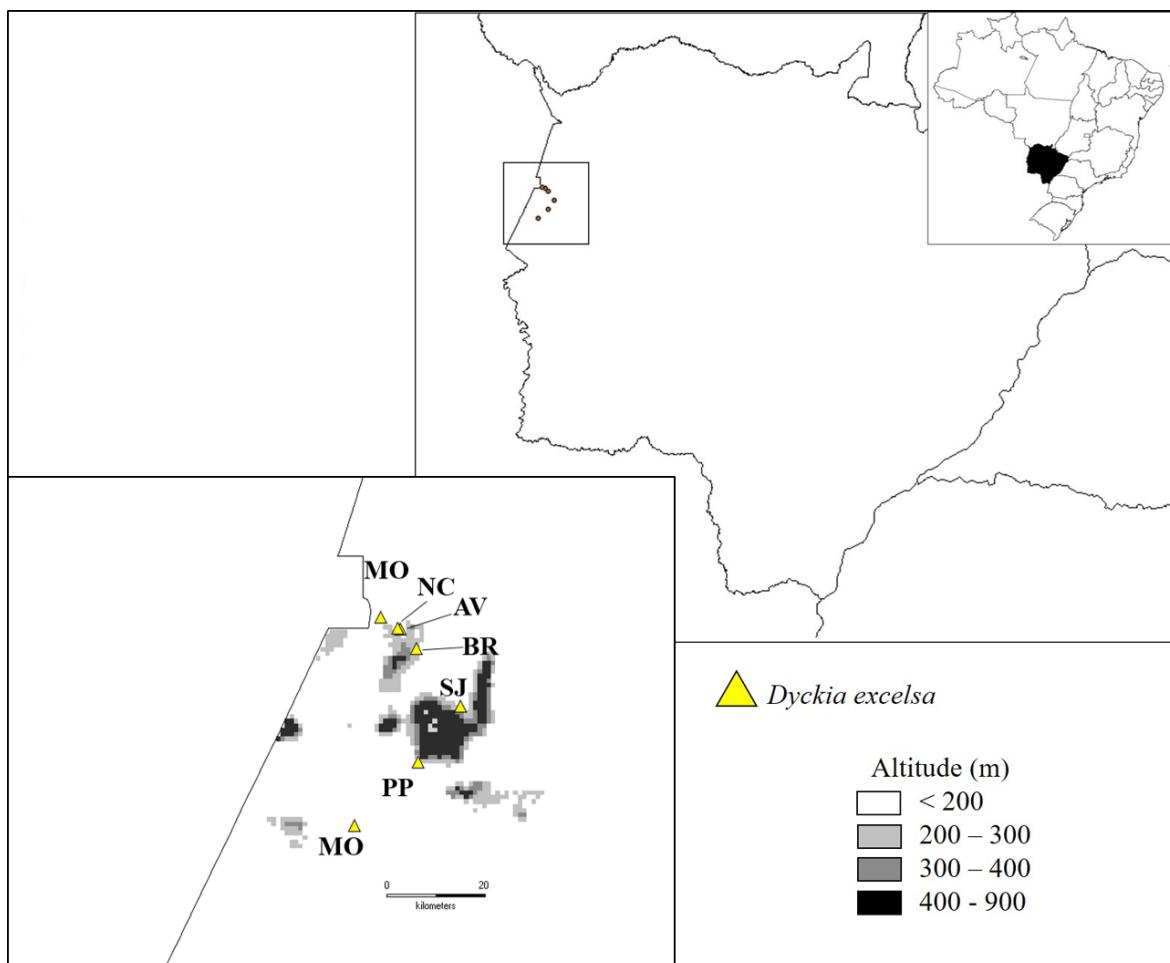
**Figure 5.** Time-calibrated Bayesian phylogenetic tree of *Dyckia excelsa* cpDNA haplotypes with posterior probabilities ( $> 0.8$ ) and ages indicated.

**Supplementary material, Figure S1:** Mostly likely number of clusters (K) by STRUCTURE HARVESTER.

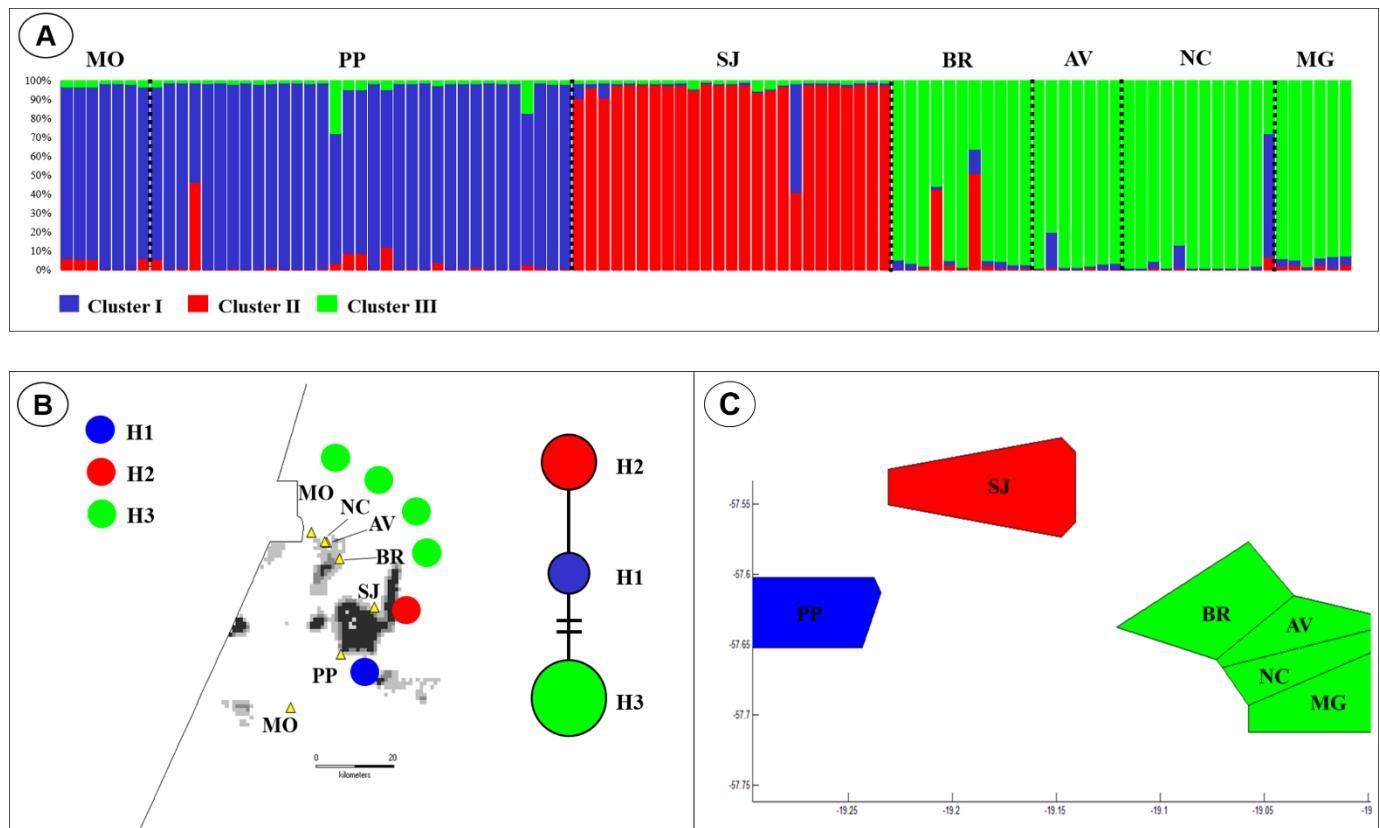
**Figure 1**



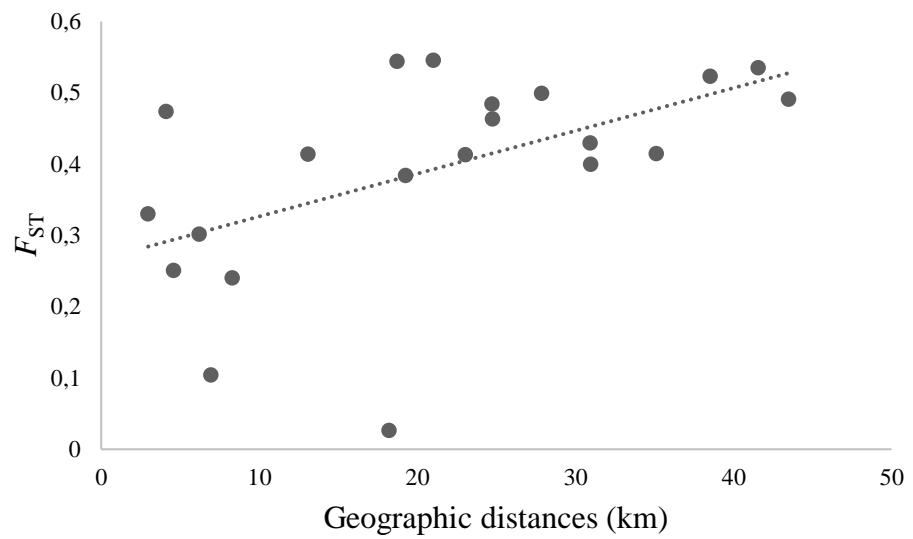
**Figure 2**



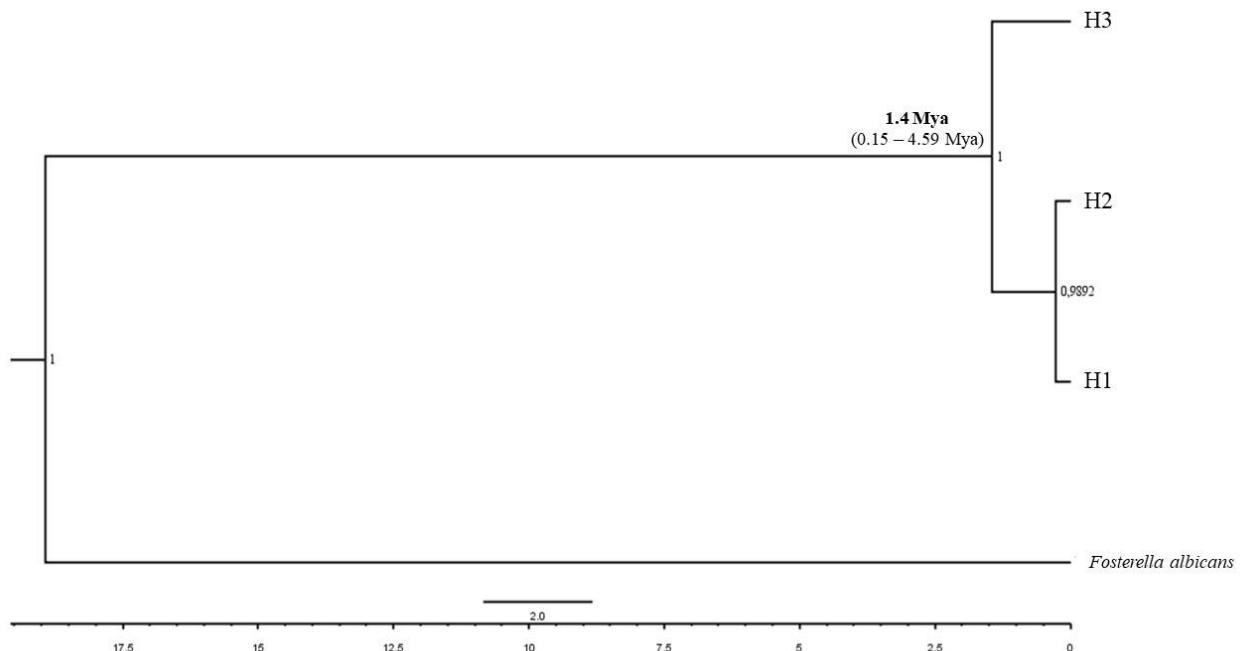
**Figure 3**



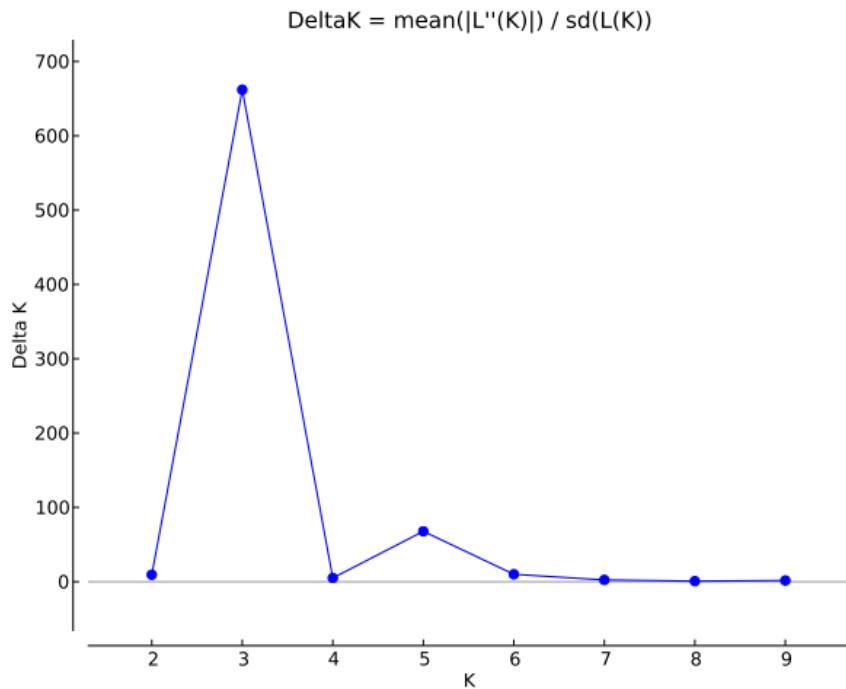
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure S1**



*Capítulo IV*  
*Considerações finais*

#### **IV. Considerações finais**

Este trabalho descreve a diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *Dyckia excelsa*, uma espécie de distribuição restrita aos afloramentos rochosos ferruginosos do Mato Grosso do Sul. Esses afloramentos rochosos, também conhecidos como *cangas*, impõem severas condições à sobrevivência, como altas temperaturas, incidência solar constante e baixo suprimento de água. Este trabalho é um dos primeiros estudos sobre aspectos genéticos da flora pantaneira, em especial da família Bromeliaceae presente na região. Essas informações também serão fundamentais para traçar estratégias de conservação da espécie em estudo.

*Dyckia excelsa*, apesar de ter sido descrita com base em material cultivado em 1993, apenas recentemente foi localizada na natureza, ocorrendo nas *cangas* do Pantanal sul-mato-grossense, apresentando distribuição restrita, com apenas uma grande população em área não protegida, uma população menor protegida e outras sendo apenas populações remanescentes dentro da área urbana de Corumbá, MS. Sendo assim, estudos como este aqui apresentados se fazem urgentes.

Para descrever a diversidade e a estrutura genética da espécie, foram utilizados marcadores moleculares do tipo microssatélites nucleares descritos para outras espécies da família Bromeliaceae, além de sequências de regiões intergênicas plastidiais. Quando utilizados em conjunto, os marcadores nucleares e plastidiais permitem a inferência de processos recentes, incluindo fluxo de pólen, e padrões filogeográficos históricos relacionados a dispersão de sementes entre populações de espécies de plantas. Os dados moleculares foram correlacionados com dados da distribuição geográfica das populações. Através dos resultados, este estudo demonstrou que *D. excelsa* apresenta baixos níveis de diversidade genética, comparáveis a outras espécies de bromélias de distribuição restrita e que habitam ambientes naturalmente fragmentados, como as *cangas*. A espécie também apresentou alta estruturação genética, com alta diferenciação genética e baixa dispersão via semente e pólen entre as populações.

O baixo nível de diversidade genética, assim como a forte estruturação genética encontrada podem ser consequências do habitat naturalmente fragmentado em que a espécie se encontra, assim como a sua distribuição restrita e tamanho pequeno da maioria das populações. Isto enfatiza a necessidade de traçar estratégias de conservação da espécie, já que cada localidade apresenta uma identidade genética única. Apenas uma população está em área protegida. As outras populações amostradas encontram-se em fazendas e remanescentes vegetais na área urbana, o que torna a sua conservação desafiadora devido a riscos de degradação pela urbanização, fogo e vandalismo, assim como o desmatamento para diferentes propósitos.

*Capítulo V*

*Referências bibliográficas (Capítulos I e IV)*

Acevedo M, Wake D, Vasquez C and Rovito S (2008) *Dendrotriton cuchumatanus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org> (ultimo acesso em 07 mar 2018).

Allendorf FW, Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Oxford: Blackwell, 642 pp.

Alves RV, Kolbek J (1994) Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio* 113:125–139.

Alves GM, Filho AR, Puchalski A, Reis MS, Nodari RO, Guerra MP (2004) Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic Forest. *Plant Genet Resour* 2:23-28.

Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr* 36:3-15.

Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007a) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol Ecol* 16:1981-1992.

Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007b) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16: 3759-3767.

Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65-77.

Beaman RS e Judd WS (1996) Systematics of *Tillandsia* subgenus *Pseudalcantarea* (Bromeliaceae). *Brittonia* 48:1 – 19.

Bennett BC, Baker MA e Gomez P (2001) Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador. *Advances in Economic Botany* 14:1–299.

Benzing DH (1980) The biology of the bromeliads. Mad River Press, California, 305 pp.

Benzing DH (2000) Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 710 pp.

Bered F, Kaltchuk-Santos E, Palma-Silva C e Paggi GM (2007) Bromélias: A beleza exótica do Novo Mundo. In: Barbieri RL & Stumpf ERT (eds) Origem e evolução de plantas cultivadas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 235–251.

Bizoux JP, Mahy G (2007) Within-population genetic structure and clonal diversity of a threatened endemic metallophyte, *Viola calaminaria* (Violaceae). *Am J Bot* 94:887-895.

Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C (2010) Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana - A test of the forest refuge hypothesis. *Ecography* 33:175-184.

Boneh L, Kuperus P, Van Tenderem PH (2003) Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculate* and *Guzmania monostachya*. *Mol Ecol Notes* 3:302-303.

Büneker HM, Pontes CR, Soares PK, Neto WL e Longhi JS (2013) Uma nova espécie reófita de *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) para a flora do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Biocienc* 11: 284-289.

Burke A (2012) The effect of altitude on arid inselbergs along a bioclimatic gradient. *J Nat Hist* 46:3011–3023.

Buzato S, Sazima M, Sazima I (2000) Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic forest sites. *Biotropica* 32: S824–S841.

Carmo FF, Carmo FF, Salgado AAR e Jacobi CM (2011) Novo sítio espeleológico em sistemas ferruginosos no Vale do Rio Peixe Bravo, Norte de Minas Gerais, Brasil. Espeleo-Tema 22: 79-93.

Carmo FF, Carmo FF, Campos IC e Jacobi CM (2012) *Cangas*: ilhas de ferro estratégicas para a conservação. Ciência Hoje 295: 48-53.

Castro PTA (2008) *Cangas*: a influência da geodiversidade na biodiversidade. In: Jacobi CM et al. (org) I Simpósio: afloramentos ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero: biodiversidade, conservação e perspectivas de sustentabilidade. UFMG/ICB, Belo Horizonte, pp 30–51.

Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI, Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD Markers. Biodivers Conserv 15:4357-4373.

Caivalcanti RB e Joly CA (2002) Biodiversity and conservation priorities in the cerrado region. In: Oliveira PS, Marquis RJ (eds) The cerrados of Brazil, ecology and natural history of a neotropical savanna. Columbia University Press, New York, pp 351–367.

Conceição AA, Pirani JR (2005) Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição Xorística e aspectos estruturais. Bol Bot Univ São Paulo 23(1):85–111

Crayn DM, Winter K, Smith JAC (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. Proc Natl Acad Sci USA101: 3703–3708.

Crayn DM, Winter K, Schulte K, Smith JAC (2015) Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: phylogenetic and ecological significance of CAM and C3 based on carbonisotope ratios for 1893 species. Biol J Linn Soc Lond 178: 169–221.

Dawson IK, Waugh R, Simons J, Powell W (1997) Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliridia sepium*. Mol Ecol 6:179–183.

Dorr II JVN (1969) Physiographic, stratigraphic and structural development of Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. United States Geological Survey. Prof. Paper, 641-A. Washington. 110p.

Forzza RC, Costa A, Siqueira-Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB e Versieux LM (2015) Bromeliaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2010) Introduction to Conservation Genetics. 2<sup>a</sup> edição. Cambridge University Press, Cambridge, 668 pp.

Ginocchio R, Baker AJM (2004) Metallophytes in Latin America: a remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. Rev Chil Hist Nat 77:185–194.

Gitzendanner MA, Weekley CW, Germain-Aubrey CC, Soltis DE, Soltis OS (2012) Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. Conserv Genet 13:223–234.

Giulietti AM, Rapini A, Andrade MJG, Queiroz LP e Silva JMC (2009) Plantas raras do Brasil. Conservation International, Belo Horizonte. 496p.

Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE e Sytsma KJ (2004) Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south American-african disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on ndhf data. Int J Plant Sci 165(4 Suppl.): S35–S54.

Givnish TJ, Millam KC, Berry PE, Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. *Aliso* 23: 1–26.

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE e Sytsma KJ (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 5:98–872.

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith AC *et al.* (2014) Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol Phylogenet Evol* 71:55–78.

Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochem Syst Ecol* 48:194–198.

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. *Biochem Syst Ecol* 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. *Bot J Linn Soc* 181: 477–490.

Goetze M, Zanella CM, Palma-Silva C, Büttow MV, Bered F (2017) Incomplete lineage sorting and hybridization in the evolutionary history of closely related, endemic yellow-flowered *Aechmea* species of subgenus *Ortgiesia* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 104(7): 1073–1087.

Goetze M, Capra F, Büttow MV, Zanella CM, Bered F (2018) High genetic diversity and demographic stability in *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), a species of sandy coastal plains (restinga habitat) in southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 186(3): 374–388.

Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Krapp F, Alves M, Wanderley MGL, Weising K (2017) Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *Am J Bot* 104 (6): 1–11.

González-Astorga J, Cruz-Angon A, Flores-Palacios A and Vovides AP (2004) Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. Ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 94:545-551.

Gouda EJ, Butcher D, Gouda K (atualização contínua) Encyclopaedia of Bromeliads Version 3.1. Disponível em: <http://botu07.bio.uu.nl/bcg/encyclopedia/brome/> Utrecht (último acesso em 07 mar 2018).

Groger A, Barthlott W (1996) Biogeography and diversity of the inselberg (laja) vegetation of southern Venezuela. *Biodiv Lett* 3:165–179.

He T, Krauss SL, Lamont BB, Miller BP, Enright NJ (2004) Long-distance dispersal in a metapopulation of *Bankasia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data. *Mol Ecol* 13:1099-1109.

He T, Smouse PE (2002) Paternity analysis in *Ophiopogon xylorrhizus* Wang et Tai (Liliaceae s.l.): selfing assures reproductive success. *J Evol Biol* 3:487-494.

Hmeljevski KV, Reis A, Montagna T, Reis MS (2011) Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from southern Brazil. *Conserv Genet* 12:761-769.

Hmeljevski KV, dos Reis MS, Forzza RC (2015) Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. J Hered 106(1):93-101.

Hmeljevski KV, Nazareno AG, Bueno ML, Reis MS, Forzza RC (2017) Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. Ecol Evol 7(13):4704–4716.

Ibisch PL, Rauer G, Rudolph D, Barthlott W (1995) Floristic, biogeographical, and vegetational aspects of pre-cambrian rock outcrops (inselbergs) in eastern Bolivia. Flora 190:299–314.

IBGE (2004) Mapa Biomas do Brasil. Disponível em: <http://mapas.mma.gov.br/geonetwork/srv/en/metadata.show?currTab=simple&id=298> (último acesso em: 07 mar 2018).

Izquierdo LY, Piñero D (2000) High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). Aust J Bot 48:645-650.

Jacobi CM, Carmo FF, Vincent RC, Stehmann JR (2007) Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. Biodivers Conserv 16:2185–2200.

Jacobi CM e Carmo FF (2008) Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. Megadiversidade 4:24-32.

Jacobi CM, Carmo FF e Campos IC (2011) Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. AMBIO 40:540-543.

Jacobi CM e Carmo FF (2012) Diversidade florística nas *Cangas* do Quadrilátero Ferrífero. IDM, Belo Horizonte. 240p.

Junk WJ, Silva CJ, Nunes da Cunha C e Watzen KM (2011) The Pantanal: Ecology, biodiversity and sustainable management of a large Neotropical seasonal wetland. Pensoft Publishers, Moscou.

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 Syst Evol* 300:1591–1614.

Krömer T, Kessler M, Herzog SK (2006) Distribution and flowering ecology of bromeliads along two climatically contrasting elevational transects in the Bolivian Andes. *Biotropica* 38:183–195.

Lavor P, van den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM (2014) Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *Am J Bot* 101(7):1167-1175.

Leme EMC (1993) Bromeliads in the Brazilian wilderness. Marigo Comunicação, Rio de Janeiro, Brazil.

Leme EMC, Ribeiro OBC e Miranda ZJG (2012) New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. *Phytotaxa* 67: 9-37.

Lexer C, Marthaler F, Humbert S, Barbará T, de la Harpe M, Bossolini E, Paris M, Martinelli G, Versieux LM (2016) Gene flow and diversification in a species complex of *Alcantarea* inselberg bromeliads. *Bot J Linn Soc* 181(3): 505-520.

Loh R, Scarano FR, Alves-Ferreira M, Salgueiro F (2015) Clonality strongly affects the spatial genetic structure of the nurse species *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 178:329–342.

Luther H (1993) An unusual night-flowering *Guzmania* from southern Ecuador. *J Bromeliad Soc* 43:195–197.

MacArthur RH e Wilson EO (1967) The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton.

Males J (2016) Think tank: water relations of Bromeliaceae in their evolutionary context. Bot J Linn Soc 181:415-440.

Medina BMO, Ribeiro KT, Scarano FR (2006) Plant–plant and plant–topography interactions on a rock outcrop at high altitude in Southeastern Brazil. Biotropica 38:27–37

Melo CA (2016) Filogeografia de cinco espécies de *Dyckia* (Bromeliaceae) endêmicas de uma região do centro-oeste brasileiro, que compreende os biomas Cerrado, Pantanal e Chaco, em comparação com uma congênere amplamente distribuída (Dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Meguro M, Pirani JR, Giulietti AM, Mello-Silva R (1994) Phytophysiognomy and composition of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. Rev Brasil Bot 17:149–166

Meireles JE e Manos PS (2018) Pervasive migration across rainforest and sandy coastal plain *Aechmea nudicaulis* (Bromeliaceae) populations despite contrasting environmental conditions. Mol Ecol 27:1261–1272.

Meirelles ST, Pivello VR, Joly CA (1999) The vegetation of granite rock outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need for its protection. Environ Conserv 26:10–20.

Moreira BA, Wanderley MGL e Barros MAC (2006) Bromélias: importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Curso de Capacitação de monitores e educadores do Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.

Murawski DA, Hamrick JL (1990) Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalena*e. Am J Bot 77:1201-1208.

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University, Nova York, 512 pp.

Neri J, Nazareno AG, Wendt T, Palma-Silva C (2015) Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae. Biochem Syst Ecol 58:34-37.

Neri J, Wendt T, Palma-Silva C (2017) Natural hybridization and genetic and morphological variation between two epiphytic bromeliads. AoB Plants 10(1): plx061.

Nunes da Cunha C e Junk WJ (2011) A preliminary classification of habitats of the Pantanal of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, and its relation to national and international wetland classification systems. In: Junk WJ, Silva CJ, Nunes da Cunha C e Watzen KM (eds) The Pantanal: Ecology, biodiversity and sustainable management of a large neotropical seasonal wetland. Pensoft Publishers, Moscou, pp 127–141.

Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. Mol Ecol Resour 8(5): 980-982.

Paggi GM, Louzada RB, Ishii IH, Takahasi A, Arruda RCO, Lorens-Lemke AP (2015) Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: Taxonomy, Geographic Distribution, and Notes on Leaf Anatomy. Syst Bot 40:129–135.

Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliad species. Mol Ecol Notes 7:654-657.

Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity* 103:503-512.

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. *Mol Ecol* 20:3185-3201.

Palma-Silva C, Leal BSS, Chaves CJN e Fay MF (2016) Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. *Bot J Linn Soc* 181:305-322.

Pamponet VCC, Alves TF, Martinez RA, Corrêa RX, Gaiotto FA (2013) Reduced genetic diversity in endemic Brazilian *Lymania* spp (Bromeliaceae) populations and implications for conservation. *Genet Mol Res* 12 (4): 4352-4362.

Paoletti MG, Taylor RAJ, Stinner BR, Stinner DH, Benzing DH (1991) Diversity of soil fauna in the canopy and forest floor of a Venezuelan cloud forest. *J Trop Ecol* 7:373–383.

Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Mol Ecol* 79:361-382.

Parmentier I (2003) Study of the vegetation composition in three inselbergs from continental Equatorial Guinea (Western Central Africa): effects of site, soil factors and position relative to forest fringe. *Belg J Bot* 136:63–72.

Parmentier I, Stévert T, Hardy OJ (2005) The inselberg Xora of Atlantic Central Africa. I. Determinants of species assemblages. *J Biogeogr* 32:685–696.

Pereira AG, Bernardi UCS, Manhães VC, Ferreira RS, Miranda FD (2017) Cross-amplification and characterization of microsatellite markers in *Alcantarea patriciae* Versieux & Wand. *Genet Mol Res* 16(2): gmr16029692.

Pirani JR, Mello-Silva R, Giulietti AM (2003) Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Brasil. Bol Bot Univ São Paulo 21:1–24.

Porembski S, Martinelli R, Ohlemüller R, Barthlott W (1998) Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. Divers Distrib 4:107–119.

Porembski S, Barthlott W (1999) *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. Harv Pap Bot 4:175–184.

Porembski S, Barthlott W (2000) Inselbergs. Biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. Springer-Verlag, Berlin.

Porembski S (2007) Tropical inselbergs: Habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. Rev Bras Bot 30:579–586.

Pott A, Silva JSV, Salis SM, Pott VJ e Silva MP (2000) Vegetação e uso da terra. In: Silva JSV (eds) Zoneamento ambiental da borda oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e adjacências. Embrapa Informação e Tecnologia, Brasília.

Pott A e Ratter JA (2011) Species diversity of terrestrial plants and human impact on the vegetation of the Pantanal. In: Junk WJ, Silva CJ, Nunes da Cunha C e Watzen KM (eds) The Pantanal: Ecology, biodiversity and sustainable management of a large neotropical seasonal wetland. Pensoft Publishers, Moscou, pp 281–300.

Provan J, Powell W, Hollingsworth PM (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plants ecology and evolution. Trends Ecol Evol 16:142–147.

Reif JC, Xia XC, Melchinger AE, Warburton ML, Hoisington DA, Beck D, Bohn M, Frisch M (2004) Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical and temperate germplasm by SSR markers. Crop Sci 44: 326–334.

Reitz R (1983) Bromeliáceas e a Malária-Bromélia Endêmica. In: Reitz R (eds) Flora ilustrada catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Fasc. Brom. 559p.

Ribeiro PC, Pinheiro LC, Domingues R, Forzza RC, Machado MA, Viccini LF (2013) Genetic diversity of *Vriesea cacuminis* (Bromeliaceae): an endangered and endemic Brazilian species. Genet Mol Res 12(2):1934-1943.

Richardson BA (1999) The bromeliad microcosm and the assessment of faunal diversity in a Neotropical forest. Biotropica 31:321–336.

Rizzini CT (1997) Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. 2nd edition. Âmbito Cultural Edições Ltda., Rio de Janeiro, p. 747.

Rogalski JM, Reis A, Reis MS, Hmeljevski KV (2009) Biologia reprodutiva da reófita *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Bot 32:691-702.

Rogalski JM, Reis A, Rogalski M, Montagna T, Reis MS (2017) Mating system and genetic structure across all known populations of *Dyckia brevifolia*: a clonal, endemic, and endangered rheophyte Bromeliad. J Hered 108:299–307.

Rubinstein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li SH, Margolis RL, Ross CA, Ferguson-Smith MA (1995) Microsatellite evolution – evidence for directionality and variation in rate between species. Nat Genet 10:337-343.

Sales E, Nebauer SG, Mus M, Segura J (2001) Population genetic study in the balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. Am J Bot 88:1750-1759.

Sarthou C, Samadi S, Boisselier-Dubayle MC (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskessii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. Am J Bot 88:861-868.

Scarano FR (2007) Rock outcrop vegetation in Brazil: a brief overview. Rev Bras Bot 30:561-568.

Scotti-Saintagne C, Dick CW, Caron H, Vendramin GG, Troispoux V, Sire P, Casalis M, Buonamici A, Valencia R, Lemes MR, Gribel R, Scotti I (2013) Amazon diversification and cross Andean dispersal of the widespread Neotropical tree species *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). J Biogeog 40: 707–719.

Schobbenhaus C, Coelho CES (1986) Principais depósitos minerais do Brasil: ferro e metais da indústria do aço. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasília. 501p.

Seine R, Porembski S, Becker U (2000) Phytogeography. In: Porembski S, Barthlott W (eds) Inselbergs. Biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. Springer, Berlin, pp 435–448.

Sheu Y, Cunha-Machado AS, Gontijo ABPL, Favoreto FC, Soares TBC, Miranda FD (2017) Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. Genet Mol Res 16(2): gmr16029636.

Sgorbati S, Labra M, Grugni E, Barcaccia G, Galasso G, Boni U, Mucciarelli M, Citterio S, Benavides Iramátegui A, Venero Gonzales L, et al. (2004). A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. Plant Biol 6:222-230.

Silva JSV, Pott A, Cardoso EL, Moraes AS, Salis SM, Pott VJ, Mauro RA, Galdino SG (2000) Avaliação integrada do Maciço do Urucum e adjacências – procedimentos ediretrizes. p.922. In: SILVA, J.S.V. (Ed.). Zoneamento ambiental da borda oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e adjacências. Brasília: Embrapa Informação e Tecnologia, 365p.

Smith LB, Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcarnioideae). Flora Neotropica Monography 14:1-662.

Smith LB, Till W (1998) Bromeliaceae. In K. Kubitzki (eds) The families and genera of vascular plants, vol. IV. Alismataceae and Commelinaceae (except Gramineae). SpringerVerlag, Berlin.

Soares LE, Goetze M, Zanella CM, Bered F (2018) Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. Genet Mol Biol 41(1): 308-317.

Soltis DE, Gilmartin AJ, Rieseberg L and Gardner S (1987) Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). Am J Bot 74:531-537.

Souza-Sobreira FB, Souza GB, Rosado CC, Miranda FD, Soares TC, Gontijo AB (2015) Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammea* (L.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. Genet Mol Res 14(4):15892-15901.

Speziale KL e Ezcurra C (2012) The role of outcrops in the diversity of Patagonian vegetation: relicts of glacial palaeofloras? Flora 207:141–149.

Takahasi A, Meirelles ST (2014) Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (*cangas*) em Corumbá, MS, Brasil. Hoehnea 41:515–528.

Tschapka M, von Helversen O (2007) Phenology, nectar production and visitation behaviour of bats on the flowers of the bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a Costa Rican lowland rain forest. J Trop Ecol 23:385–395.

Versieux LM, Wendt T (2006) Checklist of Bromeliaceae of Minas Gerais, Brazil, with notes on taxonomy and endemism. Selbyana 27(2): 107–146.

Versieux LM, Wendt T (2007) Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodivers Conserv* 16:2989–3009.

Versieux LM , Wendt T, Louzada RB, Wanderley MGL (2008) Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4:98–110.

Viana PL, Lombardi JA (2007) Florística e caracterização dos campos rupestres sobre *canga* na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 58: 159-177.

Vosgueritchian SB, Buzato S (2006) Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.)Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. *Rev Bras Bot* 29:433-442.

Warren LV, Quaglio F, Simões MG, Freitas BT, Assine ML, Riccomini C (2015) Underneath the Pantanal Wetland: A deep-time history of Gondwana assembly, climate change, and the dawn of Metazoan life. In: Bergier I and Assine ML (eds) *Dynamics of the Pantanal Wetland in South America*. Springer International Publishing, pp 1 – 24.

Wörhmann T, Weising K (2011) In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor Appl Genet* 123: 635-647.

Wörhmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K (2012) Development of 15 nuclear microsatellites markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 5(1):81-84.

Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 98:1511-1519.

Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Katchuck-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV e Bered F (2012a) Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Gen Mol Biol* 35:1020–1026.

Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis MS, Bered F (2012b) Microsatellites in the Endangered Species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and Cross-Amplification in Other Bromeliads. *Int J Mol Sci* 13:15859-15866.

Zotz G, Traunspurger W (2016) What's in the tank? Nematodes and other major components of the meiofauna of bromeliad phytotelmms in lowland Panama. *Bmc Ecol* 16:1-9.