



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise Populacional e Evolução de Bromeliaceae da Caatinga e da Floresta Atlântica do Nordeste Brasileiro

Aluno: **Rodrigo César Gonçalves de Oliveira**

Orientadora: **Prof^ª Dr^ª Ana Maria Benko Iseppon**

(Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética)

Coorientadora: **Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Lapa Wanderley**

(Instituto de Botânica do Estado de São Paulo)

Coorientadores estrangeiros:

Prof. Dr. Kurt Weising (University Kassel, Germany)

Prof. Dr. Georg Zizka (Johann Wolfgang Goethe University, Germany)

Recife, Fevereiro/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise Populacional e Evolução de Bromeliaceae
da Caatinga e da Floresta Atlântica do Nordeste
Brasileiro**

O trabalho aqui apresentado visa à obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Aluno: **Rodrigo César Gonçalves de Oliveira**

Orientadora: **Prof^ª Dr^ª Ana Maria Benko Iseppon**

(Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética)

Coorientadora: **Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Lapa Wanderley**

(Instituto de Botânica do Estado de São Paulo)

Coorientadores estrangeiros:

Prof. Dr. Kurt Weising (University Kassel, Germany)

Prof. Dr. Georg Zizka (Johann Wolfgang Goethe University, Germany)

Recife, Fevereiro/2016

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Oliveira, Rodrigo César Gonçalves de

Análise populacional e evolução de bromeliaceae da Caatinga e da Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro / Rodrigo César Gonçalves de Oliveira- Recife: O Autor, 2016.

197 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadores: Maria das Graças Lapa Wanderley,

Kurt Weising e Georg Zizka

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Bromeliácea 2. Caatinga 3. Mata Atlântica I. Iseppon, Ana Maria Benko (orientadora) II. Wanderley, Maria das Graças Lapa (coorientadora) III. Weising, Kurt (coorientador) IV. Zizka, Georg (coorientador) IV. Título

584.85

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-342

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise Populacional e Evolução de Bromeliaceae
da Caatinga e da Floresta Atlântica do Nordeste
Brasileiro

Aluno: Rodrigo César Gonçalves de Oliveira

O trabalho aqui apresentado visa à obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 24 / 02 / 2016

Profª. Dra. Ana Maria Benko Iseppon – UFPE (Orientadora - Membro interno)

Prof. Dr. Leonardo Versieux – UFRN (Membro externo)

Prof. Dra. Andrea Pedrosa Harand – UFPE (Membro externo)

Dr. Diego sotero de Barros Pinangé – UFPE (Membro externo)

Prof. Dr. Valdir Queiróz Balbino – UFPE (Membro interno)

Dr. Geyner Alves dos Santos Cruz (Suplente)

Dra. Valesca Pandolfi (Suplente)

Eu perdi o vestibular de medicina
Minha mãe ficou zangada
E eu nem um pouco
Eu não sei
Mas talvez seja muito louco
Aprender a receitar penicilina
Sou nervoso
E tenho medo de ver sangue
E a família
Quer me ver na cirurgia
Costurando quem vem lá do "bang bang"
Que aparece na TV
Pois acontece todo dia
Pra ter um anel no dedo
E um Dr. no nome
Ser um grande homem
Feliz e famoso
Mudar de repente
Meu comportamento
Tão escandaloso
Casar com uma virgem
Que nem minha tia
Não me envolver
Com essa má companhia
Que não se penteia
Frequenta a cadeia
E lugar perigoso
Tenho medo da polícia
E de bandido
Alergia a marido injuriado
E um irmão
Que não me sai do pé-do-ouvido
Me dizendo que eu devia
Estudar pra advogado
Outro diz
Que se eu estudar engenharia
Mesmo sem ter vocação
Eu enriqueça
E eu pergunto
Se esse peste gostaria
Que o prédio que eu fizesse
Lhe caísse na cabeça

Xote universitário - Accioly Neto/Santanna

Dedicatória

**Aos meus genitores, que muito além dos genes, me propiciaram amor,
carinho, um 'berço de ouro' e educação de qualidade além do que uma
prole merece.**

Agradecimentos

A **Deus** por tanto amor e pela vida.

Aos meus familiares, em especial meus pais **Isac José de Oliveira** e **Cléia Lúcia Gonçalves de Oliveira**, meu irmão **Rafael Victor Gonçalves de Oliveira** à minha tia **Cícera Virgínia Gonçalves da Silva** e à minha avó **Francisca Gonçalves da Silva** e avô **Manuel Justino da Silva** que sempre acreditaram na minha educação e no meu potencial.

À **FACEPE** (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pela bolsa de doutorado concedida, à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estágio sanduíche na Alemanha concedida através do programa **PROBRAL/CAPES/DAAD** e ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) em seu programa “Ciências sem Fronteiras” pela bolsa concedida em um segundo estágio sanduíche na Alemanha, estes que foram essenciais para o sucesso dos resultados aqui apresentados.

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª **Ana Maria Benko Iseppon** pela amizade, paciência, oportunidade de trabalho, além de todos os ensinamentos durante esses anos, por ter aberto portas aos estágios sanduíche e por propiciar condições de trabalho para minha formação acadêmica.

À amiga e Prof^ª Dr^ª **Maria das Graças Lapa Wanderley** pela presença nos trabalhos, conhecimento taxonômico compartilhado, auxílio nas coletas e estágios realizados nesse período.

Aos pesquisadores Dr^ª **Clarisse Palma da Silva** e Dr. **Fábio Pinheiro** pela amizade importantes incentivos na discussão dos resultados.

À Prof^ª Dr^ª **Ana Christina Brasileiro Vidal** pelo apoio e pela ajuda nos momentos de dificuldade durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Marcus Vinicius Alves** pela colaboração com o desenvolvimento do projeto.

Às professoras Dr^ª **Ana Paula Prata**, Dr^ª **Rosângela Simão Bianchini**, Dr^ª **Kyria Bortoleti**, aos amigos **Daniel Melo** e M.Sc. **Mateus** pelo auxílio nas coletas.

Ao meu *brother* M.sc. **Fábio da Silva do Espírito Santo** por toda ajuda nas coletas, as quais foram essenciais para que o presente trabalho fosse efetuado.

Aos amigos de colega de trabalho Dr. **Diego Sotero**, Dr. **Geyner Cruz** e Dr. **Santelmo Vasconcelos** pelo incentivo e companhia na labuta diária no laboratório.

Ao meu grande amigo M.Sc. **Jefferson Rodrigues**, muito obrigado, sem sua ajuda não teria terminado esta bendita filogenia.

Às técnicas do LGBV **Vanessa Souza** e **Jaysa** pela grande ajuda nas necessidades no laboratório. A **Tia Zizi** e **Romildo** pela solicitude.

A **Adenilda Eugênia** e à coordenação do PPGCB que me ajudaram muito em todas as necessidades inerentes à pós-graduação.

Aos Profs. Dr. **Ranilson Bezerra** e Dr^a **Teresa Correia** coordenadores do PPGCB pela paciência e auxílio nas questões da Pós-graduação.

Agradeço às sugestões das bancas de qualificação e defesa pelas importantes sugestões que fizeram e fazem meu trabalho e minha formação melhor.

Aos amigos **André Feitosa**, **Marcos Regueira**, **Danilo de Albuquerque**, **Cezar Augusto**, **Flávio Augusto**, **Lúcio Flausino**, **Lucas Galindo**, **Eloá Consuelo de las Dores**, **Aläx Albuquerque** e a todos os outros companheiros de viagem que fazem a vida mais '*enjoyable*'.

A todos os amigos e colegas do LGBV, especialmente a **João Pacífico**, **Bruna Piereck**, **Lidiane Amorim**, **Hayana Azevedo**, **Arthur Wanderley**, **Ana Rafaela Oliveira**, **Valesca Pandolfi**, **Flávia Araújo**, **Pollyana Karla**, **Silvany Araújo**, **Emanuelle Varão**, **Marx Lima**, **Marcos Oliveira**, **Wilson Oliveira**, **Pedro Lima**, Sra. **Lívia Silva** e Sr. **Carlos Silva** e tantos outros que eu gosto muito pela amizade e por ter posto a mão na massa todas as vezes que eu precisei.

Aos alunos de iniciação científica que ajudaram e atrapalharam durante esses anos **Wilka Silva**, **Hévilá Mendes**, **Gabriela Gehlen** e **Amanda Ximenes**. Obrigado meninas pela ajuda em todas as atividades que desenvolvemos nesse tempo, obrigado também por terem suportado minhas grosserias e carões.

Aos guias **Ir. Delmar**, **Seu Tula** e **Seu Licinho**, por terem me conduzido por caminhos seguros por esse Nordeste.

Danksagung

Für diese Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen ein Dankeschön.

Ein besonders großer Dank geht an die Professoren **Kurt Weising** und **Georg Zizka**, die mir nicht nur ermöglicht haben einen Teil dieser Arbeit in Deutschland zu tätigen, sondern mir auch jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin geht ein herzlicher Dank an die Arbeitsgruppen in Kassel (AG Kassel) und Frankfurt (AK Zizka), namentlich **Kai Schubert**, **Tina Wörhmann**, **Daniela Guicking**, **Irene Diebel**, **Christine Frohmut**, **Sina Möller**, **Natascha Wagner**, **Malte Zirpel**, **Marco Schmidt**, **Julio Schneider**, **Heike Kappes**, **Stefan Dresler**, **Anna Becker**, **Sascha Heller**, **Thomas Gregor**, **Frank Lappe**, **Christin Printzen** und **Rainer Döring**.

Vielen Dank auch an meinen Mitbewohner und deutschen Bruder **Tobias Kaiser** und an **Katja Bachman** für ihren Empfang in der Huttenstraße 4. Ein tiefer Dank geht an dieser Stelle auch an **Herrn und Frau Klappich**, denn ohne die Zeit bei ihnen wäre ich nicht die Person die ich heute bin.

Ich bin glücklich und dankbar für die langjährige Freundschaft zu den Leuten aus Huttenbergstraße, **Julien di Branco**, **Tanmay Bagua**, **Chalendra** und **Sysyra**, sowie meinen Freunden **Markus Brandt**, **Frederic Fichte**, **Katharina Neidhart**, **Daniel Polocke**, **Ann Kristin Reuse** und **Franziska Schütze**.

Zu guter Letz möchte ich meinem Freund **Alexander Pehmüller** für seine Gesellschaft, Hilfe, Zuneigung, Nähe, Belästigungen und vorallem seine Liebe danken.

Agradecimientos

Muchas gracias a mis amigos de lengua española que me estuvieron presentes por este tiempo en Frankfurt, **Pedro Romero**, mi amigo, mi cuate, mi socio, mi hermano, parceiro, camarada, compañero, mi pata, paisano; muchas gracias por tu ayuda y sobre todo por su amistad. A la meli (**Melissa Hidalgo**), persona más linda que tuve el placer de conocer, gracias por su amistad y a **Andrés** su compañero muchas gracias por las charlas.

Muchas gracias a Pame (**Pamela Rodriguez**), la pachangera, gracias Pame, te quiero mucho. Dedico mis trabajos en Frankfurt a vosotros. Vos extraño mucho.

Acknowledgments

Finally I would like to thank **Juraj Paule**, **Tetiana Lutsak**, **Daniele Silvestro** and **Elisa Lagostina** for the amazing hamburgers, thai food, Italian pasta in Da Cimino and all other amazing time we had together in these two times in Frankfurt.

Resumo

A Floresta Atlântica e a Caatinga são os domínios onde as Bromeliaceae apresentam maior diversidade de espécies. Tal diversidade morfológica tem sido atribuída a eventos de evolução via radiação adaptativa. Por se tratar de um grupo morfológicamente polimórfico, a delimitação de espécies e o conhecimento de sua evolução ainda são elementares. Este trabalho teve como objetivo aplicar marcadores moleculares de DNA em nível populacional e filogenético tendo os gêneros brasileiros *Encholirium* e *Hohenbergia* como modelo, com a finalidade de evidenciar os efeitos evolutivos nas populações e na filogenia desses grupos. A primeira espécie analisada no presente estudo foi *Encholirium spectabile*, avaliada em nível populacional com marcadores microssatélites. As populações amostradas apresentam grande diversidade quanto aos caracteres morfológicos, seguindo um padrão geográfico. Testamos a hipótese de que a diversidade genética seria tão expressiva quanto a morfológica. Nossos resultados sugeriram alta diversidade genética com uma distribuição uniforme, coerente com o esperado para espécies de *inselbergs*. Todavia algumas populações de Sergipe apresentaram um isolamento genético com valores de F_{ST} maiores quando comparados com as populações do restante da distribuição da espécie, no Planalto da Borborema ou ao norte da Cadeia do Espinhaço. Fundamentados nesses resultados, sugerimos que as populações de Sergipe compreendam uma linhagem críptica. A segunda espécie estudada em nível populacional foi *E. magalhaesii* a qual, em contrapartida, ocorre na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais. Foram realizadas coletas em quatro localidades. Os marcadores SSR aplicados revelaram baixa ou nenhuma estruturação genética, com moderados níveis de diversidade em equilíbrio. A comparação entre os dois cenários nos permitiu concluir que o fluxo gênico nos campos rupestres tende a ser mais efetivo que entre *inselbergs*, sugerindo que efeitos da matriz circundante dos inselbergs seriam inexistentes em ambientes de campos rupestres. Nossos estudos continuaram com o gênero *Hohenbergia*, para o qual foram utilizadas sequências de DNA para gerar uma filogenia molecular, incluindo três sequências nucleares (*PhyC*, *ETS* and *AGTI*) e duas cloroplastidiais (*ycf1_1* e *ycf1_6*). Além da observação de agrupamentos com padrões geográficos, a filogenia desse gênero agrupou espécies morfológicamente distintas em alguns clados, sugerindo que *Hohenbergia* compreende um grupo recente do ponto de vista evolutivo, sendo necessária a inserção de um maior número de sequências para melhorar o suporte dos ramos da filogenia gerada, bem como técnicas que tenham maior cobertura do genoma como AFLP. Por possuir uma evolução recente, sugere-se que *Hohenbergia* seja suscetível às flutuações populacionais causadas pelas alterações climáticas do período pleistocênico. Com base na distribuição dos táxons, modelamos cenários para três períodos, correlacionando-os com a filogenia gerada. A partir da reconstrução de ambiente ancestral propõe-se que *Hohenbergia* teria sua origem na Floresta Atlântica com sucessivas migrações para a Caatinga. O fato de utilizarmos dois gêneros de subfamílias diferentes neste trabalho nos permitiu reconhecer padrões evolutivos diferenciados, sugerindo uma evolução complexa dentro de Bromeliaceae nos ambientes da Caatinga e da Floresta Atlântica. O presente trabalho gerou ainda a descrição de uma nova espécie de *Hohenbergia* para a Floresta Atlântica brasileira, *Hohenbergia isepponae*.

Palavras-chave: *Hohenbergia*, *Encholirium*, *Inselbergs*, Campos rupestres, Microssatélites, Filogenia.

Abstract

The Atlantic Forest and the Caatinga are ecosystems where bromeliads have high species diversity. Such a morphological diversity has been attributed to evolutionary events via adaptive radiation. Because it is a morphologically polymorphic group, the species delimitation and the knowledge of its evolution are still elementary. This study aimed to apply DNA molecular markers in population and phylogenetic level in the Brazilian genera *Encholirium* and *Hohenbergia* aiming to highlight the evolutionary effects on populations and on the phylogeny of these bromeliads groups. The first studied species was *Encholirium spectabile*, evaluated at the population level with microsatellite markers. The sampled populations exhibited a great diversity of morphological characters following a geographical pattern. We tested the hypothesis that genetic diversity is as large as to morphologic. Our results suggested high genetic diversity in a uniform distribution, consistent with the expected for inselberg species. However, some populations of Sergipe presented an increased genetic isolation with higher F_{ST} values when compared with populations from the Borborema Plateau and northern Espinhaço Range. Based on these results, we suggest that populations of Sergipe comprise a cryptic lineage. The second species studied at the population level was *E. magalhaesii* that occurs in the Espinhaço Range in Minas Gerais. Sampling was carried out at four sites. SSR markers applied to these populations revealed low levels up to no genetic structuring, with moderate levels of diversity in equilibrium. The comparison between both scenarios allowed us to conclude that gene flow in the Campos Rupestres tends to be more effective than between inselbergs, indicating that effects caused by the surrounding matrix of inselbergs would not exist in the Campos Rupestres environment. Our studies continued with the genus *Hohenbergia*, for which we used DNA sequences to generate a molecular phylogeny, including three nuclear (*PhyC*, *ETS* and *AGT1*) and two chloroplast (*ycf1_1* e *ycf1_6*) sequences. Besides the observation of groups with geographical patterns, the phylogeny of this genus clustered morphologically dissimilar species, suggesting that *Hohenbergia* comprises a recent group from the evolutionary point of view, requiring the insertion of additional sequences to improve the support of the branches in phylogeny generated. Thereby it is proposed that *Hohenbergia* would be susceptible to population fluctuations caused by climate change in the Pleistocene period. Based on the distribution of the taxa, scenarios were modeled for three periods and correlated with the generated phylogeny. The ancestral environment reconstruction indicates that *Hohenbergia* possibly originated in the Atlantic Forest with successive migrations to Caatinga. The fact that we used two genera from different subfamilies allowed us to recognize different evolutionary patterns, suggesting a complex evolution within Bromeliaceae in Caatinga and Atlantic Forest environments. This work also generated the description of a new specie for the genus *Hohenbergia* from the Brazilian Atlantic Forest, *Hohenbergia isepponae*.

Key-words: *Hohenbergia*, *Encholirium*, *Inselbergs*, Campos rupestres, Microsatellites, Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** - Distribuição geográfica das Bromeliaceae nativas. A família é basicamente neotropical, ocorrendo apenas a espécie *Pitcairnia feliciana* no oeste africano. Fonte: Heywood (1993).....25
- Figura 1** - Filogenia de Bromeliaceae baseada em oito loci cloroplastidiais. Adaptado de Givnish *et al.*, 2011.....29
- Figura 3.** Diversidade morfológica em *Hohenbergia* A - *H. catinae* var. *elongata* morfologia onde os ramos basais da inflorescência são muito longos B - Morfologia típica de *H. catinae* var. *catinae*. C – *H. catinae* visão geral da Inflorescência. D - *H. horrida* – espécie exclusiva do Planalto da Borborema afim de *H. catinae* E - Hábito de *H. leopoldo-hortsii* em campos rupestres na Chapada Diamantina. F - *H. castellanosii*, epífita em restinga na Bahia. . G – *H. ramageana*. H – *H. ridleyi*. . I - *Hohenbergia* sp. J - *H. igatuensis* sob rochas K - *H. salzmanii* – a maior epífita do gênero, suas folhas chegam a medir 1.5 m. L - *H. stellata*, uma epífita da Floresta Atlântica Fotos do autor.....35

Capítulo 2

- Fig. 1** – Geographic distribution of sampled populations of *E. spectabile* in northeastern Brazil. Four geographic regions are encircled by dotted lines. The São Francisco River course is highlighted in blue. Each triangle represents one sampling location labeled by its specific initial (see Table 1 for abbreviations).....98
- Fig. 2** – Chloroplast haplotypes present in *E. spectabile* populations (Appendix S1 see Supplemental Data with the online version of this article, Table 4) analyzed in the present study. Each population is represented by a triangle and pie charts illustrates its haplotype frequency. Each haplotype is represented by a different colour.....99

Fig. 3 – Bar plot of two clusters ($K = 2$) according to a STRUCTURE analysis based on eight nSSR markers: cluster 1 is shown in red and cluster 2 in green. Populations are delimited from each other by vertical black lines. The dotted line represents the split between the populations from Sergipe region and the remaining populations..... 100

Fig. 4 – Comparison of nuclear pairwise F_{ST} values within and among clusters 1 and 2 suggested by the STRUCTURE analysis ($K = 2$). The red line indicates an F_{ST} value of 0.2..... 100

Capítulo 3

Fig. 1A – General aspect from a flowering individual of *E. magalhaesii* collected in Diamantina, Minas Gerais state. B – Map of collected plots, where each location is indicated by a circle. The state of Minas Gerais is signed on the upper left part of the map of Brazil, and the black rectangle regards the position of the collected plots..... 120

Fig. 2 Migration chart representing the $N_e m$ between pairs of localities from *E. magalhaesii* on cadeia do espinhaço in Diamantina. Each circle is signed by the initials of each locality according to the Table 1. Arrows show the direction of gene flow. Nuclear gene flow is signed by an N and is placed over the respective arrow. Chloroplast gene flow is signed by a C and is placed under the respective arrow. $N_e m$ is considered to be effective only when higher than 1 individual per generation..... 121

Capítulo 4

Figura 1 – Árvore filogenética bayesiana obtida no programa *BEAST pelo método de coalescência (CO). Os valores dos ramos representam a probabilidade posterior. As barras laterais marcam os dois subgêneros de *Hohenbergia*. *H.* subg. *Hohenbergia* é marcado na cor verde. Observe que este se apresenta como uma linhagem filogenética polifilética..... 144

Figura 2. Grupamento *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* s.s. extraído da Figura 1. Os três subclados marcados com barras laterais, sendo em amarelo o subclado que inclui a maioria das espécies; em laranja as espécies de *H. horrida* e *H. ridleyi* originárias da margem norte do Rio São Francisco e um terceiro subclado (em vermelho), menos relacionado, p qual inclui as espécies de Floresta Atlântica com distribuição mais a sul além de *H. humilis*..... 145

Figura 3 – Reconstrução de ambiente ancestral (Modelo BBM – RASP) para o clado das *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia*. A - Floresta Atlântica (Azul). B – Chapada Diamantina (Púrpura). C - Caatinga (Amarelo ocre). AC – Floresta Atlântica e Caatinga (Verde). O ancestral comum do grupo é originário da Floresta Atlântica..... 146

Figura 4 – Modelos medianos de modelagem climática de nicho dos algoritmos DOMAIN e MAXENT para *H. ramageana*, *H. catinae* e *Hohenbergia* spp. endêmicas da Chapada Diamantina na região leste brasileira. A linha azul-clara representa o Rio São Francisco. A- Modelo para *H. ramageana* no período do último interglacial (140 Ka). B – *H. ramageana* no período do último máximo glacial (~22 Ka). C – Modelo de *H. ramageana* para o período do ótimo de temperatura do holocênico (~6Ka). D- Modelo para *H. catinae* no período do último interglacial (140 Ka). E – *H. catinae* no período do último máximo glacial (~22 Ka). F – Modelo de *H. ramageana* para o período do ótimo de temperatura do holocênico (~6 Ka). G- Modelo para *Hohenbergia* spp. da Chapada Diamantina no período do último interglacial (140 Ka). H – *Hohenbergia* spp. da Chapada Diamantina no período do último máximo glacial (~22 Ka). I – Modelo de *Hohenbergia* spp. da Chapada Diamantina para o período do ótimo de temperatura do holocênico (~6 ka)..... 147

Capítulo 5

Figure 2. A – I *H. isepponi* (Rodrigo Oliveira 50 & Mendes-Silva). A. Inflorescence showing the lateral branches with the spikes, B. Leaf blade showing the apical spine, C. Detail of the inflorescence, D. Flower and floral bract, E. Floral bract, showing the apex mucronulate, F. Asymmetric sepal showing the apex mucronate, G. Petal with adnate stamen, H. Flower in longitudinal section, showing the ovules in the apex of ovary, I. Stigma. (Illustration by Klei Sousa)..... 184

Figure 2. Inflorescence detail on the *Hohenbergia ramageana* complex. A – *H. ramageana* (Photo. Maciel). B – *Hohenbergia ridleyi*. C – *H. isepponii*..... 185

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Espécies de *Hohenbergia* ocorrentes no Brasil (compilado de FORZZA et al., 2014).....33

Tabela 2. Dados disponíveis quanto à contagem de cromossomos em *Hohenbergia* (revisados por GITAÍ *et al.*, 2014).....34

Capítulo 2

Table 1. Plant material of *E. spectabile* analyzed in the present study. Abbreviations of populations used in the main text are listed in the first column.....93

Table 2. Genetic characteristics of eight nuclear SSR loci in 20 populations of *E. spectabile* ($N = 196$)94

Table 3. Characteristics of four chloroplast microsatellite markers and results of genotyping in *E. spectabile* ($N = 234$). GeneBank accession numbers for each locus are given in the last column.....95

Table 4. Genetic diversity in populations of *E. spectabile* revealed by eight nSSR and four cpSSR markers.....96

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) and degrees of freedom (df) for eight nuclear and four chloroplast SSR markers in populations of *E. spectabile*. The groups revealed by a Bayesian STRUCTURE analysis ($K = 2$) were considered for both marker types.....97

Capítulo 3

Table 1

Collected populations from *E. magalhaesii*. N - Number of samples per populations, Lat. - Latitude and Long. - Longitude. All mats have been collected at the indicated locations122

Table 2

Genetic diversity in populations of *E. magalhaesii* revealed by four nSSR and four cpSSR markers.....122

Table 3

Analysis of molecular variance (AMOVA) and degrees of freedom (d.f.) revealed by four nuclear and four chloroplast SSR markers in localities of *E. magalhaesii*.....122

Table 4

F_{ST} values per pairs of locations. The stars sign that the values are significant. For population names see Table 1.....123

LISTA DE ABREVIACÕES

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de tamanho em fragmentos amplificados.

AMOVA – Análise Molecular de Variância

APP – Área de Proteção Permanente

EST – *Expressed Sequence Tags* – Etiquetas de Sequências Expressas

F_{IS} – índice de endocruzamentos

F_{ST} – Índice de estruturação populacional

ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat* – Sequências Intercaladas entre Repetições Simples

N_m – Número de migrantes por geração

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

PSF – Pollen Seed Flow – Fluxo Pólen - Semente

SDTF – Seasonal Dry Tropical Forest – florestas tropicais decíduais secas

SSR – *Simple Sequence Repeats* – Repetições de Sequências Simples

Sumário

INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica.....	Erro! Indicador não definido.
1. Sistemática, Taxonomia e Evolução das Bromeliaceae	Erro! Indicador não definido.
1.1. Considerações Gerais.....	Erro! Indicador não definido.
1.2 Relações filogenéticas entre as Bromeliaceae	Erro! Indicador não definido.
1.3 O Gênero <i>Encholirium</i>	Erro! Indicador não definido.
1.3.1. Complexo <i>Encholirium spectabile</i>	Erro! Indicador não definido.
1.4 O Gênero <i>Hohenbergia</i>	Erro! Indicador não definido.
2. Fitofisionomias Tropicais do Leste Brasileiro – Floresta Tropical Úmida Atlântica e Floresta Sazonal Semi-decidual Seca das Caatingas	Erro! Indicador não definido.
2.1. Floresta Tropical Úmida Atlântica.....	Erro! Indicador não definido.
2.2. Domínio das Caatingas	Erro! Indicador não definido.
2.3 A Cadeia do Espinhaço e seus Campos Rupestres	Erro! Indicador não definido.
3. <i>Inselbergs</i> – Um Modelo de Ilhas Terrestres...	Erro! Indicador não definido.
4. Marcadores Moleculares e Genética de Populações em Bromeliaceae	Erro! Indicador não definido.
4.1 Principais Marcadores Utilizados em Genética de Populações	Erro! Indicador não definido.
4.1.1. Marcadores Codominantes - Microsatélites.	Erro! Indicador não definido.
4.1.2. Estudos de Genética Populacional em Bromeliaceae e suas contribuições para o conhecimento da biologia do grupo.	Erro! Indicador não definido.
5. Referências Bibliográficas	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 2 – Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): Evidence for cryptic speciation. **Erro! Indicador não definido.**

ACKNOWLEDGEMENTS	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT.....	Erro! Indicador não definido.
INTRODUCTION	Erro! Indicador não definido.
MATERIALS AND METHODS	Erro! Indicador não definido.
RESULTS	Erro! Indicador não definido.
DISCUSSION	Erro! Indicador não definido.
LITERATURE CITED	Erro! Indicador não definido.
TABLES.....	Erro! Indicador não definido.
FIGURES	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 3 – Population genetic structure in *Encholirium magalhaesii* (Bromeliaceae), an endemic species from Espinhaço Range **Erro! Indicador não definido.**

Abstract	Erro! Indicador não definido.
1. Introduction.....	Erro! Indicador não definido.
2. Materials and Methods	Erro! Indicador não definido.
3. Results.....	Erro! Indicador não definido.
4. Discussion.....	Erro! Indicador não definido.
5. Conclusions.....	Erro! Indicador não definido.
Acknowledgments.....	Erro! Indicador não definido.
References.....	Erro! Indicador não definido.
Figures.....	Erro! Indicador não definido.
Tables	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 4 – História evolutiva e biogeografia de *Hohenbergia* (Bromeliaceae):
extensiva diversidade morfológica e baixo sinal filogenético molecular **Erro!**

Indicador não definido.

1. Introdução **Erro! Indicador não definido.**
2. Materiais e Métodos **Erro! Indicador não definido.**
3. Resultados **Erro! Indicador não definido.**
4. Discussão **Erro! Indicador não definido.**
5. Referências **Erro! Indicador não definido.**
6. Figuras **Erro! Indicador não definido.**
7. Apêndice 1 – Lista das espécies e genes sequenciados **Erro! Indicador não definido.**
8. Apêndice 2 - Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) gerada pelo programa RaxmlGUI. Vermelho – *Hohenbergia* sugb. *Hohenbergia* Azul – *H.* subg. *Wittmackiopsis* Verde – *H. castellanosii* e *H. littoralis*. **Erro! Indicador não definido.**
9. Apêndice 3 - Árvore Bayesiana gerada pelo programa Mr. Bayes. **Erro! Indicador não definido.**

Apêndice 4 – Mapas intermediários para a montagem dos modelos, os gráficos de AUC e Kappa são apresentados para cada modelo. **Erro! Indicador não definido.**

CAPÍTULO 5 – A new species of *Hohenbergia* (Bromeliaceae) from the Atlantic Forest in Pernambuco State, Brazil. **Erro! Indicador não definido.**

CONCLUSÕES **Erro! Indicador não definido.** 6

ANEXO 1 – Composições fotográficas das características citogenéticas de *Hohenbergia* compilados por Amanda Ximenes. **Erro! Indicador não definido.**

ANEXO 2 – Resumos apresentados em congressos **Erro! Indicador não definido.**

1. Resumo apresentado no I Bromevo – Porto de Galinhas – PE - 2015 **Erro! Indicador não definido.**

2. Resumo apresentado no I Bromevo – Porto de Galinhas – PE - 2015 **Erro!**
Indicador não definido.
3. Resumo apresentado no XI congresso latinoamericano de Botânica – Salvador –BA – 2015.**Erro! Indicador não definido.**
5. Poster apresentado no Seminário do DAAD para estudantes brasileiros- Bonn 2015 **Erro!**
Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

Sinais do processo evolutivo que atua sobre os seres vivos podem ser observados em diversos níveis de análise, sejam eles as flutuações da diversidade genética das populações e sua estrutura, a filogenia dos grupos associada aos aspectos geográficos, biogeográficos e ecológicos, bem como em evidências morfológicas/adaptativas que são o resultado da evolução em si, suprimento básico da taxonomia. Por motivos diversos a serem evidenciados neste documentno, dentre os grupos de plantas e ambientes mais atrativos para este tipo de estudo, destacam-se a família Bromeliaceae e a região leste do Brasil.

Bromeliaceae tem a região leste brasileira como uma das porções da América do Sul com maior diversidade de espécies, sendo também uma das possíveis regiões de diversificação e radiação adaptativa da subfamília Bromelioideae no domínio da Floresta Atlântica. Esta região é também considerada alvo de colonização recente pela subfamília

Pitcairnioideae através dos Andes (MARTINELLI *et al.*, 2008; GIVNISH *et al.* 2011). Além disso, no leste do Brasil também se encontram dois domínios vegetacionais muito importantes em termos de diversidade, a Floresta Tropical Atlântica e a Floresta Estacional Semidecidual da Caatinga, cujas relações ainda não são muito claras.

A Floresta Atlântica *s.s.* abrange a região costeira brasileira desde o Rio Grande do Norte até o Paraná e apresenta grande diversidade e riqueza florística. Esta formação de floresta figura entre uma das floras mundiais mais ameaçadas, sendo considerado como prioritário para a conservação (MYERS *et al.*, 2000). Dois grandes centros de diversidade para vegetais e animais são encontrados na Floresta Atlântica, um no sul da Bahia e o outro entre os estados de Pernambuco e Alagoas, sendo ambos considerados refúgios Pleistocênicos (CARNAVAL & MORITZ, 2008).

A Caatinga apresenta níveis de diversidade menores que a Floresta Atlântica, entretanto apenas uma pequena amostragem de sua diversidade é conhecida, devido principalmente às sazonalidades climáticas onde espécies só são reconhecidas em um curto espaço de tempo em estudos ainda escassos (GIULIETTI *et al.*, 2004). Do ponto de vista de conservação, a Caatinga tem sido bastante impactada, em vista da existência de projetos de infraestrutura de grande porte no semiárido Nordeste. Ao contrário da Floresta Atlântica a Caatinga é tratada como refúgio dos dias atuais, sendo considerada um dos núcleos mais estáveis desde o período pleistocênico (PENNINGTON *et al.*, 2000; WERNECK *et al.*, 2011; COLEVATTI *et al.*, 2013).

Bromeliaceae é uma das principais famílias vegetais que compõem ambientes xéricos como inselbergs (POREMBSKI *et al.*, 2007). Neste contexto, dois gêneros se destacam na maioria das floras de afloramentos rochosos: *Hohenbergia* Schult. & Schult.f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (*e.g.*: GOMES & ALVES, 2009 SILVA *et al.*, 2009). Ambos apresentam grande diversidade de espécies nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço baiana e mineira (VERSIEUX *et al.*, 2008). Uma das provas da importância desses dois gêneros é a predominância de populações de espécies como *E. spectabile* Mart. ex Schult. & Schult.f. e *Hohenbergia caatingae* Ule em afloramentos rochosos da Caatinga (BARACHO, 2003; FORZZA, 2005; VERSIEUX *et al.*, 2008; GOMES & ALVES, 2009). Além disso, são grupos que apresentam carência de estudos com abordagem filogeográfica ou evolutiva.

Face à ampla ocorrência dessas espécies nos ambientes citados, as mesmas apresentam-se como ótimos elementos para estudos populacionais, filogeográficos e filogenéticos. Além disso, o gênero *Hohenbergia* apresenta ampla distribuição na Caatinga e na Floresta Atlântica, havendo representantes com hábito terrestre (rupícola, arenícola) ou epifítico (BARACHO, 2003), sendo sua filogenia e vários aspectos evolutivos até o momento desconhecidos.

O outro gênero aqui em questão – *Encholirium* – é exclusivo de afloramentos rochosos, sendo *E. spectabile* Mart ex. Schult. (conhecida popularmente como macambira de flecha) a espécie com maior distribuição nesses ambientes no nordeste brasileiro, apresentando uma grande diversidade em caracteres morfológicos observáveis em escala geográfica (FORZZA *et al.*, 2005). Tal diversidade é observada, por exemplo, em espécimes da porção norte da Cadeia do Espinhaço (regiões de Jacobina – BA, Gentio do Ouro – BA e Morro do Chapéu – BA), que apresentam pedicelos menores que a maioria dos espécimes de outras regiões. Em função da variabilidade morfológica de *Encholirium spectabile*, foram propostos sinônimos para esta espécie nos últimos tratamentos taxonômicos do gênero, sendo a mesma espécie descrita sob distintos epítetos, procedentes de diferentes regiões como a Chapada Diamantina e o Planalto da Borborema (FORZZA *et al.*, 2005).

Questões semelhantes envolvendo diversidade genética populacional têm sido resolvidas através da aplicação de marcadores microssatélites em outras bromeliaceae, por se tratar de uma técnica já dominada por alguns grupos de pesquisa no Brasil. Só na família Bromeliaceae, esses marcadores têm sido aplicados em estudos populacionais correlacionados com eventos de hibridização, fluxo gênico interespecífico, introgressão, refúgios pleistocênicos, etc. (BARBARÁ *et al.*, 2007, 2009; PALMA-SILVA *et al.*, 2009, 2011; BOISSELIEUR-DUBAYLE *et al.*, 2010).

Em vista das lacunas existentes quanto ao conhecimento dos padrões de evolução e a diversificação dos gêneros *Hohenbergia* e *Encholirium*, com ênfase nos representantes do Nordeste Brasileiro, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- Realizar estudos populacionais envolvendo membros do complexo específico *Encholirium spectabile*, no sentido de avaliar padrões de diversidade

morfológica e genética do grupo com o auxílio de marcadores moleculares à fim de contribuir com os conhecimentos acerca da evolução de Bromeliaceae, bem como da biodiversidade da Caatinga;

- Avaliar populações de *E. magalhaesii* da Cadeia do Espinhaço com o auxílio de marcadores moleculares, com a finalidade de observar os padrões de diversidade e estruturação genética, correlacionando-os com a biologia do grupo e inferir quanto à diversidade ;
- Gerar a primeira filogenia molecular para *Hohenbergia*, inferindo sobre sua diversidade genética e agregando conhecimento acerca da evolução do grupo;

No presente tratamento ainda é descrita uma nova espécie para o gênero *Hohenbergia*.

CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica

1. Sistemática, Taxonomia e Evolução das Bromeliaceae

1.1. Considerações Gerais

Bromeliaceae é uma família de monocotiledôneas composta por 58 gêneros e estimadas 3.352 espécies (LUTHER, 2008), apresentando-se bastante diversificada em características como hábitos, caracteres vegetativos e florais. Apesar da maioria das espécies serem bem delimitadas morfológicamente, é comum encontrar certa plasticidade nos caracteres morfológicos (ZIZKA *et al.*, 2009).

Filogeneticamente Bromeliaceae agrupa-se no clado Poales (APGIII, 2009). Atualmente está dividida em oito subfamílias (GIVNISH *et al.*, 2007): (I) Bromelioideae, que inclui plantas com frutos carnosos e a que reúne maior diversidade genérica, dentre eles *Ananas* Mill, *Aechmea* Ruiz & Pav. e *Hohenbergia*; (II) Tillandsioideae, sendo os maiores

Vriesea Lindl. e *Tillandsia* L.; (III) Brocchinioideae, grupo tratado como o filogeneticamente mais basal, com apenas um gênero, *Brochinia*; (IV) Lindmanioideae, compreende dois gêneros *Connellia* N.E. Br. e *Lindmania* Mez; (V) Puyoideae apenas o gênero *Puya* Molina; (VI) Navioideae o gênero *Navia* Schult & Schult.f. e outros gêneros relacionados; (VII) Hechtioideae, composta pelo gênero *Hechtia* Klotzsch e, por fim, (VIII) Pitcairnioideae, que inclui *Pitcairnia* L'Hér. e gêneros associados a ambientes xéricos, como *Dyckia* e *Encholirium*.

Bromeliaceae apresenta distribuição nos continentes americanos, em climas tropicais ou subtropicais, tendo como limites de distribuição o sul dos Estados Unidos e o norte da Patagônia, sendo seus centros de diversidade o Brasil Central, em especial no domínio da Floresta Atlântica e a região dos Andes desde o Peru até o México e os Tepuis no Planalto das Guianas (GIVNISH *et al.*, 2011). Há apenas uma espécie disjunta, ocorrente em afloramentos rochosos no continente africano (*Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbz) (POREMBSKI & BARTHLOTT, 1999; GIVNISH *et al.*, 2004; ZIZKA *et al.*, 2009). Altitude e latitude são fatores ambientais que aparentam ter influência na distribuição de Bromeliaceae, o gênero *Puya*, por exemplo, possui maior diversidade em regiões de média latitude e média altitude (JABAILY & SYTSMAN, 2010).

Indivíduos pertencentes às bromeliáceas são encontrados em quase todos os biomas neotropicais (Figura 1), incluindo as florestas tropicais úmidas e secas, savanas e campos rupestres (BENZING, 2000; GIVNISH *et al.*, 2004; ZIZKA *et al.*, 2009). Uma ampla distribuição geográfica e ecológica é normalmente atribuída à plasticidade de hábitos (saxícola, terrestre, epifítico e rupícola), fatores que também estão associados a características como a fisiologia CAM e a presença de tanques, os quais foram elementos chave para o sucesso evolutivo das Bromelioideae, especialmente no que se refere ao hábito epifítico e na ocupação de novos espaços como as regiões de florestas tropicais decíduas secas (SDTF) (SCHULTE *et al.*, 2009; SILVESTRO *et al.*, 2014). Assim, estima-se que estas características tenham sido importantes para a colonização e evolução das Bromeliaceae, em especial para as Bromelioideae na região leste do Brasil (SILVESTRO *et al.*, 2014)

A reconstrução da biogeografia histórica das Bromeliaceae sugere uma origem no Planalto das Guianas, uma vez que os grupos mais basais são encontrados majoritariamente

nessas regiões, seguindo-se de colonizações por radiação adaptativa em ambientes da América Central e dos Andes e a partir daí colonizando os ambientes mais baixos do Brasil central, em especial a Floresta Atlântica (GIVNISH *et al.*, 2011). O território brasileiro foi ocupado por frentes de colonização oriundas do norte, a partir do planalto das Guianas e do oeste, com sua fonte nos Andes. Esta colonização se deu inicialmente pelos gêneros xerófilos *Dyckia* e *Encholirium* e por fim pelas Bromelioideae. Os gêneros *Pitcairnia*, *Navia*, *Hechtia*, *Dyckia* e *Puya* são provavelmente os grupos de evolução mais recente em Bromeliaceae (GIVNISH *et al.*, 2007, 2011).

Com base em informações filogenéticas de origem cloroplastidial, acredita-se que os gêneros *Dyckia* Schult & Schult.f., *Encholirium* e *Deuterocohnia* Mez – que compõem um clado de plantas associadas a ambientes xéricos da família Pitcairnioideae – se diferenciaram a partir de um evento cladogenético ocorrido há cerca de 8,5 milhões de anos atrás, com provável origem na região central dos Andes, o que compreende a um evento evolutivo recente das Bromeliaceae no domínio brasileiro (GIVNISH *et al.*, 2011).

Em relação às Bromelioideae, propõe-se que sua origem se deu na Floresta Atlântica brasileira com contínuas diversificações e migrações na América do Sul, nos Andes e na América Central, não apenas em um único evento, mas em eventos subsequentes e relacionados a fenômenos edafoclimáticos (SCHULTE *et al.*, 2009; SASS & SPECHT, 2010).

Com ampla distribuição no continente americano, as Bromeliaceae apresentam um elevado grau de endemismo em regiões neotropicais, em especial no Brasil, o qual possui cerca de 1.200 espécies, das quais cerca de 1.000 são endêmicas. Este corresponde ao segundo maior grupo dentre as monocotiledôneas, sendo apenas menor que Orchidaceae (FORZZA *et al.*, 2014). A Floresta Atlântica brasileira é um dos ambientes com grande diversidade, apresentando 51 gêneros e 803 espécies, sendo 10 gêneros e 653 espécies exclusivos desse domínio (MARTINELLI *et al.*, 2008). Com localização paralela à Floresta Atlântica entre os estados de Minas Gerais e Bahia, a Cadeia do Espinhaço compreende outro ambiente com alta diversidade de Bromeliaceae, sendo encontrados 26 gêneros e 224 espécies, das quais 111 são endêmicas (VERSIEUX *et al.*, 2008).



Figura 1 - Distribuição geográfica das Bromeliaceae nativas. A família é basicamente neotropical, ocorrendo apenas a espécie *Pitcairnia felicitiana* no oeste africano. Fonte: Heywood (1993).

Estudos taxonômicos têm gerado floras em que as Bromeliaceae são contempladas. Como exemplos podemos citar trabalhos como a Flora Neotropical (SMITH & DOWNS, 1974, 1977, 1979); a Flora Catarinense, que (REITZ, 1983), a Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso (WANDERLEY & MOLLO, 1992); a Flora de Grão Mogol (WANDERLEY & FORZZA, 2003), a Flora do Estado de São Paulo (WANDERLEY & MARTINS, 2007) além dos trabalhos taxonômicos para a família no Nordeste Brasileiro (SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006). Diversas revisões taxonômicas foram realizadas para gêneros específicos, como por exemplo aquelas realizadas para *Portea* Brongn, *Lymania* Read e *Encholirium* (COFFANI-NUNES, 2004; SOUZA, 2004 FORZZA, 2005).

Bromeliaceae caracteriza-se de modo geral pelas plantas herbáceas, epífitas, terrícolas ou saxícolas, com caule em geral curto, rizomatoso. As raízes podem ser funcionais ou não, raramente ausentes (algumas espécies do gênero *Tillandsia* L.). As folhas são alternas e espiraladas, dispostas em roseta, com margem lisa ou aculeada. Apresentam inflorescências racemosas, simples ou compostas. Suas flores são trímeras, bissexuadas, ou raramente unissexuadas, de simetria em geral actinomorfa, mais raramente ligeiramente zigomorfa. As flores apresentam prefloração imbricada; corola dialipétala ou gamopétala. Os estames são em número de seis, dispostos em dois verticilos, com filetes livres ou unidos entre si ou adnatos à corola e algumas vezes às sépalas. As anteras têm deiscência rimosa. Nectários septais estão presentes. Possui ovário gamocarpelar, súpero,

semínfero a ínfero, trilocular de placentação axial e pluriovulado. O fruto normalmente varia de cápsula a baga, às vezes formando um sincarpo, como no caso do abacaxi (gênero *Ananas* Mill.) (GIVNISH *et al.*, 2011; SOUSA & WANDERLEY, 2015)

Interessantes interações ecológicas ocorrem entre representantes de Bromeliaceae e diversos animais e outros seres vivos, em especial nas espécies que apresentam fitotelma (tanque que acumula água). O ambiente da fitotelma forma um microclima propício para a reprodução de espécies de anfíbios bromelícolas (ROMERO *et al.*, 2010) e até mesmo de espécies vegetais especializadas que habitam os tanques de bromélias, como *Anthurium bromelicola* Mayo & L.P.Félix (MAYO *et al.*, 2000). Beija-flores e morcegos são os principais polinizadores da família, porém abelhas, besouros e vespas também são visitantes florais, muitas vezes devido à presença de recompensas florais como néctar e pólen (e.g. SAZIMA *et al.*, 1989; SIQUEIRA-FILHO & MACHADO., 1998, KAEHLER *et al.*, 2005).

Do ponto de vista citogenético a família é caracterizada por um conjunto diploide de $2n=50$, sendo este número o mais predominante dentre as espécies analisadas, seguindo-se de $2n=48$ nas Tillandsioideae. Em Bromelioideae também foram encontrados $2n=54$, $2n=58$ o incomum $2n=34$ no gênero *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (GITAÍ *et al.*, 2014). Eventos de disploidia e poliploidia, bem como bimodalidade e a presença de cromossomos B são os principais eventos evolutivos estruturais ocorrentes nas Bromeliaceae (GITAÍ *et al.*, 2014). O tamanho do genoma apresenta correlação positiva com o número cromossômico e eventos de poliploidização, exceto para Tillandsioideae (GITAÍ *et al.*, 2005).

1.2 Relações filogenéticas entre as Bromeliaceae

Apesar de grande diversidade morfológica, as Bromeliaceae apresentam em geral baixa disponibilidade de sítios filogeneticamente informativos (sinal filogenético), especialmente em nível genérico (e.g.: TERRY *et al.*, 1997; BARFUSS *et al.*, 2005; CHEW *et al.*, 2010; AGUIERRE-SANTORO *et al.*, 2015). Em sua maioria, marcadores cloroplastidiais têm fornecido resultados pouco polimórficos. Entretanto, a adição dos estudos incluindo as regiões gênicas nucleares, tem aprimorado a resolução das análises

filogenéticas, especialmente no nível de família ou subfamília (Figura 2) (GIVNISH *et al.*, 2011; SILVESTRO *et al.*, 2014). Por outro lado, pouca informação filogenética molecular é encontrada em nível genérico, especialmente em grupos de Bromeliaceae evolutivamente mais recentes (VERSIEUX *et al.*, 2012; KRAPP *et al.*, 2014; AGUIERRE-SANTORO *et al.*, 2015).

Durante anos as filogenias de Bromeliaceae têm utilizado genes cloroplastidiais, e só recentemente foram incluídas sequências nucleares. Terry *et al.* (1997) utilizaram 30 espécies de 29 gêneros diferentes da família para a construção de uma filogenia baseada apenas no gene *ndhF*, sendo aí observadas as primeiras evidências que levaram à classificação atual de Bromeliaceae. Entretanto, a nova classificação da família, passando de três para oito subfamílias, só veio a acontecer muito mais tarde, baseada inicialmente no gene *ndhF* (GIVNISH *et al.*, 2007) e posteriormente confirmada a partir de uma gama de genes cloroplastidiais (GIVNISH *et al.*, 2011).

É marcante notar que as filogenias propostas para Bromelioideae, apresentam baixa resolução nos grupos associados à *Aechmea*, mesmo em filogenias multilocus (SCHULTE *et al.*, 2009; AGUIERRE-SANTORO *et al.*, 2015). Apesar disso, Bromelioideae surge nas análises filogenéticas moleculares como um grupo monofilético (*e.g.* GIVNISH *et al.*, 2007; SCHULTE *et al.*, 2009), porém os estudos indicam que homoplasias morfológicas são comuns nas filogenias moleculares dos gêneros dessa subfamília, como no gênero *Ronnbergia* E. Morren & André (AGUIERRE-SANTORO *et al.*, 2015). Schulte *et al.*, (2009) definiram *Aechmea* como um grupo polifilético dentro do *Core-Bromelioideae* de modo que apresenta associação com os demais gêneros, incluindo *Hohenbergia*. De um modo geral, *Aechmea* possui uma grande variação do ponto de vista morfológico que dificulta a sua delimitação taxonômica, levando a arranjos subgenéricos artificiais. Ainda como parte das Bromelioideae, os clados mais basais que incluem o gênero *Bromelia* L., *Orthophytum* Beer e *Cryptanthus* apresentam melhor resolução filogenética entre espécies (GIVNISH *et al.*, 2013; LOUZADA *et al.*, 2014). Dada a baixa resolução dentre os grupos de Bromelioideae, e as constantes politomias e árvores com ramos muito curtos, sugere-se que esta subfamília possua uma evolução muito recente (EVANS *et al.*, 2015).

Em contracorrente, as Pitcairnioideae têm apresentado maiores polimorfismos em genes utilizados para análises filogenéticas, porém estas ainda são escassas e limitadas a

alguns gêneros (REX *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2013). O gênero *Fosterella* destaca-se como o mais estudado, apresentando filogenias fundamentadas em AFLP ou genes cloroplastidiais e nucleares (REX *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2013). Até o momento, seis diferentes linhagens de *Fosterella* são visualizadas, reconhecendo-se os grupos rusbyi, albicans, weberbaueri, micrantha, weddeliana e penduliflora (REX *et al.*, 2009). Em Pitcairnioideae a origem evolutiva dos grupos parece estar relacionada com o posicionamento geográfico das espécies, de modo que o fator geográfico é mais determinante nas relações entre espécies, tanto para *Fosterella* quanto para *Dyckia* (WAGNER *et al.*, 2013; KRAPP *et al.*, 2014). Nas filogenias citadas, houve inclusão de espécies do gênero *Encholirium*, as quais sempre se agruparam de forma basal em um grupo relacionado à *Dyckia*.

De modo similar às outras subfamílias de Bromeliaceae, Tillandsioideae apresenta grande variação na sua diversidade de hábitos e morfologia da planta, entretanto nem sempre as filogenias e os genes aplicados têm apresentado diversidade satisfatória (CHEW *et al.*, 2010, VERSIEUX *et al.*, 2012). Entretanto, é indiscutível a monofilia de Tillandsioideae, apresentando dois grandes clados para esta subfamília, um relacionado ao gênero *Vriesea* e outro aos demais gêneros (BARFUSS *et al.*, 2005).

Puyoideae, composta apenas pelo gênero *Puya* nos estudos morfológicos que vem sendo apresentados, divide-se em dois subgêneros, os quais um corresponde às *Puyas* ocorrentes no Chile (subgênero *Puya*) e outro ocorrente na porção tropical e subtropical dos Andes (subgênero *Puyopsis*), sendo os mesmos corroborados com base nas análises filogenéticas (JABAILY & SYTSMA, 2010).

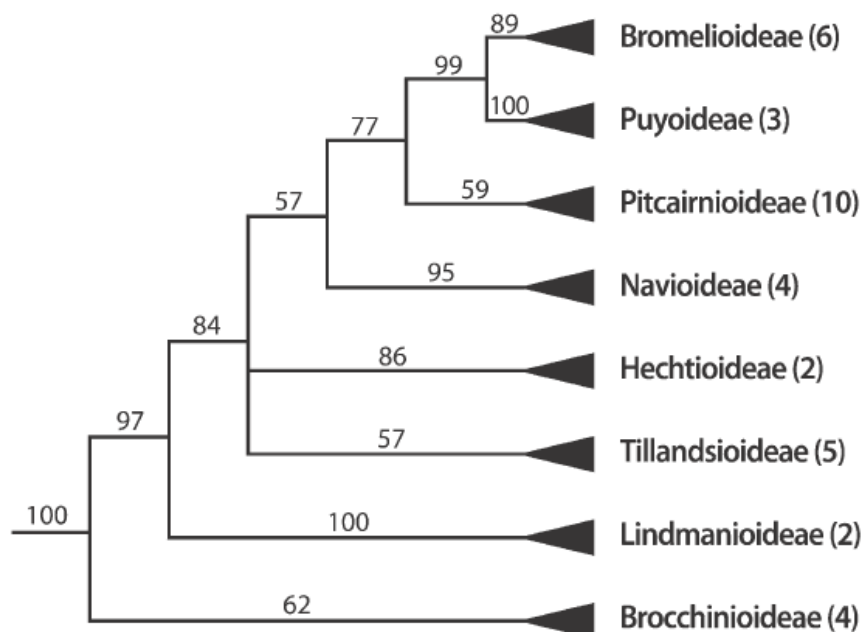


Figura 3 - Filogenia de Bromeliaceae baseada em oito loci cloroplastidiais. Adaptado de Givnish *et al.*, 2011.

1.3 O gênero *Encholirium*

Encholirium é um gênero exclusivamente brasileiro, composto por 31 espécies reconhecidas até o momento (FORZZA & LEME, 2015; FORZZA *et al.*, 2014). Apresenta distribuição em toda a região centro-leste do Brasil, normalmente entre altitudes de 400 a 800 m, sendo o principal gênero em termos de cobertura vegetal em afloramentos rochosos do Nordeste brasileiro (FORZZA, 2005; GOMES & ALVES, 2009). As espécies de *Encholirium* compreendem ervas terrestres com raízes funcionais e possuem como características marcantes a inflorescência terminal, com o pedúnculo emergindo do centro da roseta. As flores são em sua maioria esverdeadas, porém pétalas lilases, amareladas e alaranjadas também podem estar presentes. Apresentam fruto seco do tipo cápsula septicida, com inúmeras sementes aladas empilhadas (FORZZA, 2005).

Morcegos são os principais polinizadores registrados para o gênero, entretanto, beija-flores, apídeos e outros mamíferos também são registrados como visitantes florais e polinizadores (SAZIMA *et al.*, 1989; LORENZON *et al.*, 2003, LEAL *et al.*, 2006; SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006; CHRISTIANINI *et al.*, 2013; QUEIROZ *et al.*, 2016).

Há registros de protoginia (amadurecimento anterior da parte feminina das flores em relação à masculina), estratégia que evita temporalmente a autofecundação. Ainda tratando da reprodução, as diferenças nos atributos florais são essenciais para a evolução das espécies, o que evita a polinização entre espécies afins e simpátricas (CHRISTIANINI *et al.*, 2013). A dispersão de sementes é de limitado alcance, uma vez que sementes dispersas pelo vento tendem a atingir apenas as redondezas da planta mãe (CAVALLARI *et al.*, 2006). O estabelecimento de plântulas na natureza é limitado pela disponibilidade de ambiente com as condições ideais para a germinação e fixação, porém poucas plântulas são visualizadas em campo, apesar das sementes apresentarem bom grau de germinação em laboratório (FORZZA, 2001, 2005). A reprodução clonal, apesar de não ter sido evidenciada em estudos recentes, claramente ocorre, observando-se estolões que conectam indivíduos em touceiras (CAVALLARI *et al.*, 2006; HMELJEVSKI *et al.*, 2015).

O gênero apresenta centro de diversidade na porção mineira da Cadeia do Espinhaço (VERSIEUX *et al.*, 2008). Todavia, novas espécies têm sido descritas em afloramentos de calcário do Brasil central (FORZZA & LEME, 2015). Dois grupos morfológicos têm sido sugeridos para o gênero, um compreendendo as espécies de pedicelo mais longo (*longipedicellatum*) e outro abrangendo espécies de pedicelos mais curtos (RAUH, 1987; FORZZA, 2005).

Nas filogenias mais recentes apresentadas para a família os grupos *Encholirium/Dyckia* foram incluídos e os arranjos resultantes são expressos em cladogramas bastante derivados e separados do grupo principal das Pitcairnioideae, compreendendo um clado associado a ambientes xéricos. (GIVNISH *et al.*, 2007, 2011) A partir de uma filogenia baseada em genes cloroplastidiais e o nuclear *PhyC* (KRAPP *et al.*, 2014) argumenta-se que *Dyckia*, *Encholirium* e *Deuterocohnia* compreendam táxons estreitamente aparentados, considerados como grupo irmão de *Fosterella*. Devido à sua distribuição, *Encholirium* aparenta ter seu centro de origem e de diversidade na Cadeia do Espinhaço, corroborando a ocorrência de algumas espécies de *Dyckia*. Contudo, o monofiletismo de *Encholirium* foi posta em cheque por aparecer como um grupo parafilético na filogenia de Krapp *et al.* (2014).

Várias espécies de Himenópteros e Hemípteros são ocasionalmente encontradas no pedúnculo das inflorescências/infrutescências de *Encholirium*. Por exemplo, as abelhas da

espécie *Xylocopa abbreviata* Hurd & Moure nidificam nas hastes de *E. spectabile*. Trata-se de um inseto de distribuição restrita e seu registro foi feito apenas em afloramentos rochosos onde ocorrem espécies de *Encholirium* (RAMALHO *et al.*, 2004). Devido à grande quantidade de endemismos e constantes pressões antrópicas (como a construção de estradas ou empreendimentos rurais), algumas espécies de *Encholirium* estão listadas entre aquelas ameaçadas de extinção (CAVALLARI, 2004).

1.3.1. Complexo *Encholirium spectabile*

Encholirium spectabile Mart. ex Schult é a principal espécie encontrada em afloramentos rochosos do nordeste setentrional brasileiro, apresentando a maior abrangência de todo o gênero. Ocorre em afloramentos rochosos entre as latitudes três e 12 sul, desde o estado do Ceará, até a porção norte da Chapada Diamantina, apresentando ainda ocorrência em alguns brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba (SMITH & DOWNS, 1974; FORZZA, 2005; SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006).

Forzza (2005) descreve *Encholirium spectabile* como uma espécie facilmente reconhecida por suas inflorescências em forma de seta e flores vistosas de cor amarelada, pediceladas a curto-pediceladas. Destaca ainda a marcante variação de seus caracteres morfológicos que podem apresentar alta diversidade em uma mesma população, incluindo o tamanho das flores, ramificações da inflorescência e tamanho da raque. Por outro lado, há caracteres que apresentam um padrão geograficamente estruturado, como o comprimento dos pedicelos, a proporção de largura e comprimento das brácteas florais, a proporção de largura e comprimento das sépalas e pétalas e a forma da bráctea floral (FORZZA, 2005). Esta grande diversidade morfológica levou à descrição de nomes distintos para a mesma espécie, passando *E. spectabile* a ter os seguintes sinônimos *E. pernambucanum* L.B.Sm e *E. densiflorum* Mart. ex Schult & Schult.f. Dentre as variações apresentadas pela espécie, observam-se os mais proeminentes as populações oriundas da região norte da Chapada Diamantina, nos municípios de Jacobina e Morro do Chapéu, cujos indivíduos representam os extremos de variação, com flores sésseis e brácteas florais menores. A floração ocorre duas vezes por ano para a espécie, entre os meses de novembro e dezembro e junho e julho (FORZZA, 2005).

Estudos de biologia reprodutiva mostraram que *E. spectabile* é uma espécie primariamente quiropterófila, porém em um sistema reprodutivo misto, onde outros vetores apresentam sucesso na polinização, como beija-flores e principalmente o timbu, compreendendo o primeiro registro de polinização por vertebrados na família (QUEIROZ *et al.*, 2016). Testes com grão de pólen marcado apontaram que a polinização entre populações tende a ter um alcance apenas local, entre afloramentos próximos. Além disso, a presença de matrizes antropizadas entre os afloramentos tende a reduzir a eficiência da polinização entre populações (WANDERLEY *et al.*, *in press*).

Pouco se conhece quanto à citogenética do gênero *Encholirium*, sabendo-se que este grupo apresenta o mesmo número básico ($x = 25$) proposto para a maioria das Bromeliaceae, tendo sido reportado o número $2n = 50$ para *E. spectabile* (revisado por GITAÍ *et al.*, 2014).

1.4 O Gênero *Hohenbergia*

Hohenbergia foi descrito por Schult & Schult.f. (1830), sendo o gênero assim nomeado em homenagem à família do príncipe do antigo principado alemão de Württemberg, patrono alemão da botânica, chamado Hohenberg (GRANT, 1998). Sua proposição baseou-se em divergências do gênero *Aechmea*, separando-se *Hohenbergia* pelas inflorescências em forma de espigas, em detrimento de cachos (SMITH & DOWNS, 1979). São características de *Hohenbergia*: inflorescências congestas em ramos formando espigas, normalmente lanosas, brácteas da inflorescência imbricadas e um tubo epígino inconspícuo ou quase ausente (MACIEL & LOUZADA, 2014).

Tabela 1 - Espécies de *Hohenbergia* ocorrentes no Brasil (compilado de FORZZA *et al.*, 2014).

<i>Espécies</i>	<i>Espécies</i>
<i>H. aechmeioides</i> Leme	<i>Hohenbergia lativaginata</i> J.R. Maciel & Louzada
<i>Hohenbergia arcuata</i> Leme & M.Machado	<i>Hohenbergia lemei</i> H.Luther & K.Norton
<i>Hohenbergia augusta</i> (Vell.) E.Morren.	<i>Hohenbergia leopoldo-horstii</i> E.Gross, Rauh & Leme.

<i>Hohenbergia barbarespina</i> Leme & Fraga	<i>Hohenbergia littoralis</i> L.B.Sm.
<i>Hohenbergia belemii</i> L.B.Sm. & Read	<i>Hohenbergia loredanoana</i> Leme & L.Kollmann
<i>Hohenbergia blanchetii</i> (Baker) E.Morren ex Mez	<i>Hohenbergia magnispina</i> Leme
<i>Hohenbergia brachycephala</i> L.B.Sm.	<i>Hohenbergia membranostrobilus</i> Mez
<i>Hohenbergia burle-marxii</i> Leme & W.Till	<i>Hohenbergia minor</i> L.B.Sm.
<i>Hohenbergia capitata</i> Schult. & Schult.f.	<i>Hohenbergia mutabilis</i> Leme & L.Kollmann
<i>Hohenbergia castellanosi</i> L.B. Sm. & Read	<i>Hohenbergia oxoniensis</i> W. Weber
<i>Hohenbergia catinae</i> Ule	<i>Hohenbergia pabstii</i> L.B.Sm. & Read
<i>Hohenbergia conquistensis</i> Leme	<i>Hohenbergia penna</i> E. Pereira
<i>Hohenbergia correia-araujoi</i> E. Pereira & Moutinho	<i>Hohenbergia ramageana</i> Mez
<i>Hohenbergia edmundoi</i> L.B.Sm. & Read	<i>Hohenbergia reconcavensis</i> Leme & Fraga
<i>Hohenbergia eriantha</i> (Brongn. ex Baker) Mez	<i>Hohenbergia ridleyi</i> (Baker) Mez
<i>Hohenbergia estevesii</i> E. Pereira & Moutinho	<i>Hohenbergia rosea</i> L.B.Sm. & Read
<i>Hohenbergia flava</i> Leme & C.C.Paula	<i>Hohenbergia salzmännii</i> (Baker) E.Morren ex Mez
<i>Hohenbergia halutheriana</i> Leme	<i>Hohenbergia sandrae</i> Leme
<i>Hohenbergia hatschbachii</i> Leme	<i>Hohenbergia stellata</i> Schult. & Schult.f.
<i>Hohenbergia horrida</i> Harms	<i>Hohenbergia undulatifolia</i> Leme & H.Luther
<i>Hohenbergia humilis</i> L.B.Sm. & Read	<i>Hohenbergia utriculosa</i> Ule
<i>Hohenbergia igatuensis</i> Leme	<i>Hohenbergia vestita</i> L.B.Sm.
<i>Hohenbergia itamarajuensis</i> Leme & Baracho	<i>Hohenbergia viridorubra</i> Leme
<i>Hohenbergia lanata</i> E.Pereira & Moutinho	

O gênero apresenta dois subgêneros com uma disjunção entre a região do Caribe e o escudo leste brasileiro, havendo uma única espécie ocorrente nos dois domínios, *Hohenbergia stellata* Schult. & Schult. f. (SMITH & DOWNS, 1979). Os dois subgêneros são distinguíveis por características como óvulos caudados no subg. *Hohenbergia* (único com representantes brasileiros), diferentemente de óvulos obtusos no subg. *Whitmackiopsis* (SMITH & DOWNS, 1979). O gênero compreende 66 espécies aceitas (Tabela 1), das quais 47 ocorrem no Brasil, sendo 46 exclusivamente brasileiras, com maior concentração das espécies no estado da Bahia (FORZZA *et al.*, 2014; GOVAERTS *et al.*, 2014).

Do ponto de vista filogenético *Hohenbergia* tem sido identificada como um grupo parafilético (SASS & SPECH, 2010; SILVESTRO *et al.*, 2014), onde os dois subgêneros se encontram separados. A única espécie que ocorre em toda a distribuição referida para o gênero – *Hohenbergia stellata* – tem se agrupado nas filogenias às espécies do subgênero *Hohenbergia* que envolve plantas originárias do Caribe (e.g. SILVESTRO *et al.*, 2014); entretanto, esta posição ainda carece de confirmação.

Citogeneticamente *Hohenbergia* apresenta poucos estudos, incluindo apenas oito táxons analisados (Tabela 2), apontando para uma conservação quanto ao número cromossômico, onde todas as espécies apresentam um conjunto haploide de $n=25$ sem nenhuma variação identificada dentro do gênero, com exceção da presença de cromossomos B, identificados em *H. utriculosa* e *H. penna*, a qual também apresentou os menores cromossomos em tamanho (COTIAS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2000; BELINTANII *et al.*, 2005). Dados de valor C e outras técnicas citogenéticas são ainda ausentes na literatura.

Tabela 2. Dados disponíveis quanto à contagem de cromossomos em *Hohenbergia* (revisados por GITAÍ *et al.*, 2014).

Espécie	Contagem (2n)	Fonte
<i>H. blanchetii</i>	50	Ceita <i>et al.</i> , 2008.
<i>H. castellanosi</i>	50	Bellintani <i>et al.</i> , 2005.
<i>H. catingae</i>	50	Cotias-de-oliveira <i>et al.</i> , 2000, Ceita <i>et al.</i> , 2008.
<i>H. correia-araujo</i>	50	Bellintani <i>et al.</i> , 2005.
<i>H. littoralis</i>	50	Cotias-de-oliveira <i>et al.</i> , 2000.
<i>H. penna</i>	50 + 2B	Bellintani <i>et al.</i> , 2005.
<i>H. stellata</i>	50	Cotias-de-oliveira <i>et al.</i> , 2000.
<i>H. utriculosa</i>	50 + 2B	Cotias-de-oliveira <i>et al.</i> , 2000.

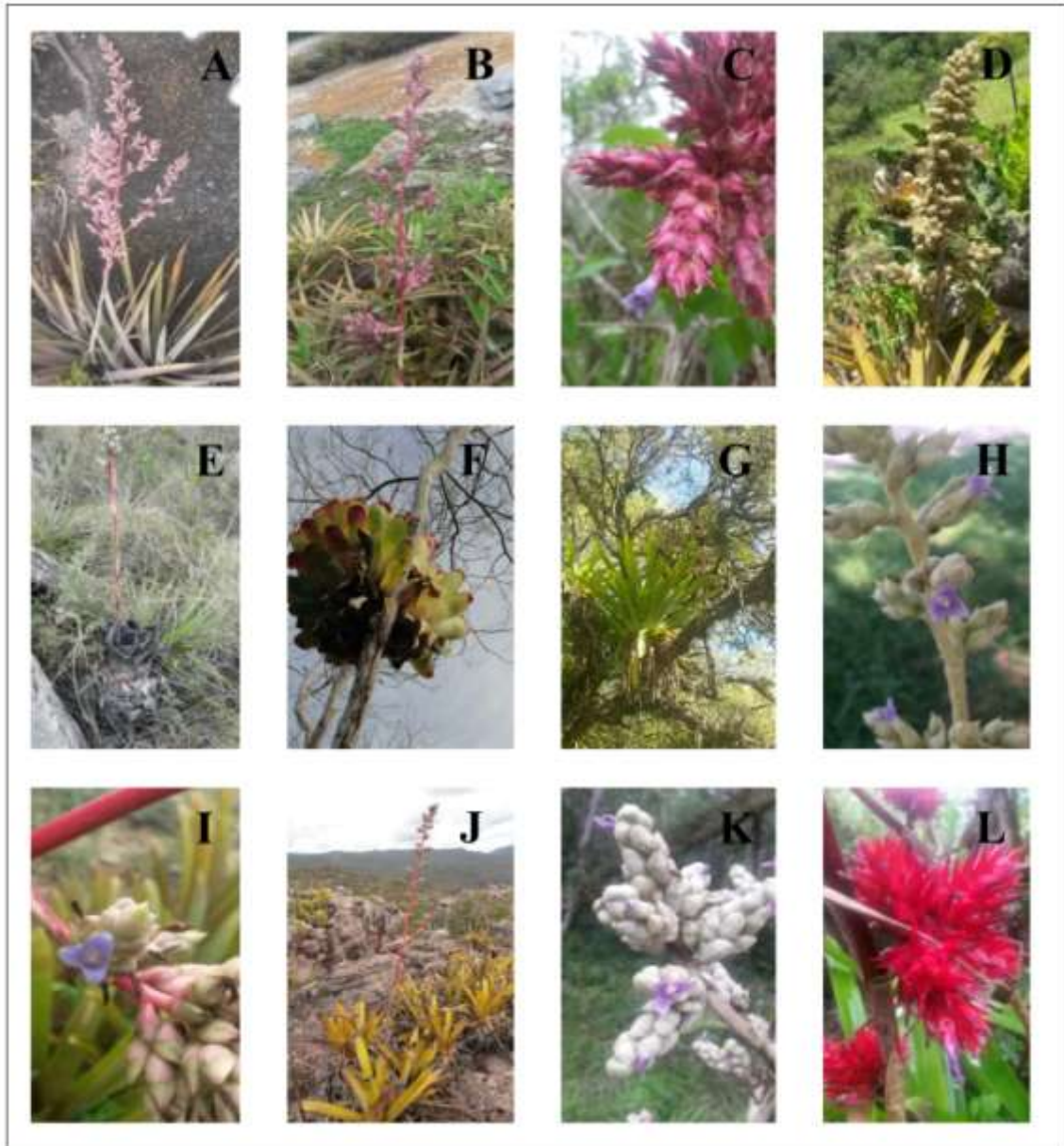


Figura 3. Diversidade morfológica em *Hohenbergia* **A** - *H. catingae* var. *elongata* morfologia onde os ramos basais da inflorescência são muito longos **B** - Morfologia típica de *H. catingae* var. *catingae*. **C** - *H. catingae* visão geral da Inflorescência. **D** - *H. horrida* - espécie exclusiva do Planalto da Borborema afim de *H. catingae* **E** - Hábito de *H. leopoldo-hortsii* em campos rupestres na Chapada Diamantina. **F** - *H. castellanosii*, epífita em restinga na Bahia. **G** - *H. ramageana*. **H** - *H. ridleyi*. **I** - *Hohenbergia* sp. **J** - *H. igatuensis* sob rochas **K** - *H. salzmanii* - a maior epífita do gênero, suas folhas chegam a medir 1.5 m. **L** - *H. stellata*, uma epífita da Floresta Atlântica Fotos do autor.

Quanto à distribuição, *Hohenbergia* ocorre nas florestas tropicais caribenhas, normalmente como epífitas. No Brasil são encontradas na Floresta Tropical Atlântica do Rio Grande do Norte à São Paulo e na Floresta Estacional Semidecidual da Caatinga, em uma faixa paralela ao litoral desde o Rio Grande do Norte à Bahia. *Hohenbergia* apresenta algumas espécies presentes em ambientes de restinga, apresentando ainda elevado grau de endemismos na cadeia do espinhaço e florestas do Sul da Bahia (BARACHO, 2003; COGLIATTI-CARVALHO *et al.*, 2008; VERSIEUX *et al.*, 2008; DA SILVA OLIVEIRA *et al.*, 2014; GOMES & GUEDES, 2014; LEITMAN *et al.*, 2014). Em todos os casos, *Hohenbergia* apresenta hábitos terrícola e rupícola (principalmente na Caatinga), bem como epifíticos (principalmente na Floresta Atlântica) (Figura 3).

Quanto à polinização, espécies de *Hohenbergia* são prioritariamente ornitófilas, com diferentes espécies de beija-flores como polinizadores, alguns apresentando padrão de territorialidade e outros mais generalistas a depender do local (SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006).

2. Fitofisionomias Tropicais do Leste Brasileiro – Floresta Tropical Úmida Atlântica e Floresta Sazonal Semi-decidual Seca das Caatingas

2.1. Floresta Tropical Úmida Atlântica

A Floresta Atlântica se encaixa na definição de Floresta Tropical Úmida, sendo esta última a segunda maior floresta pluvial das Américas. Apresenta uma distribuição longitudinal no continente Americano, ocorrendo nas proximidades da costa Brasileira desde o Nordeste brasileiro até o norte da Argentina (TABARELLI *et al.*, 2005). A área original desse domínio cobre cerca de um milhão e meio de quilômetros quadrados, correspondendo a cerca de 17% do território brasileiro (JOLY *et al.*, 2014). A estrutura Floresta Atlântica compreende duas fisionomias características, podendo apresentar-se como florestas úmidas montanas ou litorâneas presentes em baixas altitudes (menor que 1000 metros) e florestas semidecíduas presentes em platôs no interior do continente, em altitudes acima de 600 metros (MORELLATO & HADDAD, 2000). Devido a esta

plasticidade ambiental, cinco tipos florestais são encontrados, sendo: i) Floresta Ombrófila Densa, ii) Floresta Ombrófila Aberta, iii) Floresta Ombrófila Mista, iv) Floresta Semidecídua Sazonal e v) Floresta Decídua (JOLY *et al.*, 2014).

Apesar de ocupar menos de 2% da superfície do planeta, a Floresta Atlântica é considerada um dos *hotspots* de biodiversidade (comunidades taxonômicas classificadas de acordo com a diversidade de espécies), abrigando mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta. Embora possua apenas cerca de 35% de seus remanescentes presentes em áreas de preservação, esses ainda abrigam um grande número de insetos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, além de mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, o que significa 2,7% dos endemismos de plantas do planeta (MYERS *et al.*, 2000).

A chegada dos portugueses iniciou o processo de desmatamento e fragmentação da Floresta Atlântica (MORELLATO & HADDAD, 2000; GALINDO-LEAL & CÂMARA, 2005). A degradação da floresta impulsionou a economia com o extrativismo do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Fabaceae) iniciando a derrubada de árvores, gerando um dos primeiros grandes impactos sobre a biodiversidade da floresta (BARBEDO *et al.*, 2002). Posteriormente, a monocultura de cana-de-açúcar e a abertura de áreas para pastagens aceleraram a retirada da floresta original gerando mais fragmentação e isolamento das populações de vegetais e animais, com uma matriz inóspita à vida silvestre (MORENO, 2003).

Em se tratando do que restou da Floresta Atlântica, os dados mais recentes indicam que apenas 11,75% da floresta original ainda persistem, localizando-se as maiores concentrações de fragmentos no Sudeste do país, em especial na Serra do Mar que possui cerca de 36% da cobertura original. No entanto 50% dos fragmentos restantes são menores que 50 ha., sendo a distância entre esses, maior que cem metros, considerada insuficiente para suportar a sobrevivência da floresta (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Uma vez que a destruição da floresta teve como ponto inicial o Nordeste do Brasil, as floras ali localizadas apresentam histórico de antropização, de modo que a Floresta Atlântica está entre as áreas de conservação prioritárias (TABARELLI, 2005).

Apesar disso, acredita-se que os efeitos da fragmentação sobre as comunidades de plantas e animais podem ser diferentes, a depender do grau de perturbação, de características internas do fragmento, grau de isolamento dos fragmentos os quais variam

de acordo com as características do ambiente e tamanho de cada fragmento além de efeitos de borda exercidos por diferentes tipos de matrizes bem como na composição da comunidade ali residente (COLLI *et al.* 2003). Devido às grandes perturbações nos 500 anos de história registrados, acredita-se que muito da flora original nem chegou a ser conhecida (MORELATTO & HADDAD, 2000).

O isolamento dos aglomerados florestais por uma matriz alienígena tende a alterar o movimento energético, material e o fluxo de indivíduos, de forma que estes fatores culminam em efeito de borda, o qual atua como uma força seletiva onde apenas espécies capazes de sobreviver às alterações tendem a ocupar esses espaços (PACIENCIA & PRADO, 2004).

Para a Floresta Atlântica foram reconhecidos pelos menos dois importantes refúgios localizados, incluindo (1) o sul da Bahia e (2) a porção entre os estados de Pernambuco e Paraíba, regiões que correspondem a grandes centros de endemismo para animais e plantas (CARNAVAL & MORITZ, 2008). Refúgios do pleistoceno são conhecidos por serem eventos de isolamento de populações de espécies de florestas tropicais, gerando o isolamento necessário para permitir especiação alopátrica, sendo identificado sua influência na especiação de outras bromeliaceae como *Vriesea gigantea* (PALMA-SILVA *et al.*, 2009).

2.2. Domínio das Caatingas

O domínio das Caatingas se enquadra na definição do bioma Floresta Tropical Decidual Seca (SDTF), sendo o maior núcleo contínuo encontrado em toda a distribuição desse bioma no globo. Este tipo de bioma caracteriza-se do ponto de vista pluviométrico pela existência de uma grande diferença hídrica nas estações do ano, onde a estação chuvosa é curta e muitas vezes sem um período definido (PENNINGTON *et al.*, 2009). A Caatinga em si ocupa cerca de 70% da região Nordeste do Brasil e compreende a uma área de aproximadamente 800.000 km², a qual abrange o interior dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (BENEVIDES *et al.*, 2007; PINHEIRO & ALVES, 2007).

Na Caatinga predomina um clima semiárido com bastante sazonalidade, com estação chuvosa restrita a apenas três meses, ainda assim de forma irregular, seguida de longos períodos de seca principalmente nas regiões mais centrais. A média de pluviosidade anual na região varia de 240 mm a 1.500 mm (LEAL *et al.*, 2005). Os solos no Domínio das Caatingas são de origem gnáissica/granítica ou sedimentar. Apresentam uma distribuição e formação variável com regiões de grande fertilidade – como a bacia sedimentar da Ibiapaba – e de baixa fertilidade – como a Chapada do Apodi (VELLOSO *et al.*, 2002).

As regiões de caatinga compreendem de forma geral superfícies pediplanadas, com em média 500 m de altitude, por vezes interrompidas por ocorrência de maciços e rochas cristalinas residuais, planaltos e chapadas sedimentares, chegando até o litoral na porção norte. Há ainda outras superfícies de relevo, como superfícies aplainadas, maciços e rochas cristalinas residuais, campos de *inselbergs*, planícies fluviais, faixas de praia, campos de dunas e falésias, entre outros (GUERRA *et al.*, 2009).

As comunidades da Caatinga apresentam diferenças significativas nos padrões de conservação de nicho e grupos filogenéticos, o que se atribui principalmente um efeito do tipo de solo que cada comunidade ocupa (MORO *et al.*, 2015).

A flora da Caatinga possui uma grande diversidade de espécies (*e.g.* PINHEIRO & ALVES, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2010), apresentando grande diversidade beta, sendo diversidade florística local determinada pelas diferenças nos fatores edáficos, como tipo de solo e capacidade de retenção de água (ALCOFORADO-FILHO *et al.*, 2003; PENNINGTON *et al.*, 2009; MORO *et al.*, 2015). A quantidade anual de chuvas também pode ser limitante desta diversidade, especialmente para o componente herbáceo mais suscetível à secas (LEMOS & RODAL, 2002; MORO *et al.*, 2015). Entretanto, na flora herbácea, os fatores de solo, não influenciam significativamente no tipo de vegetação, exceto por algumas espécies, como *E. spectabile* e algumas Cactaceae que são associadas à presença da rocha maciça (SILVA *et al.*, 2009).

Devido à complexidade de ambientes e solos, além da notável diversidade da flora, o domínio das Caatingas pode ser diferenciado com base em algumas regiões características, sendo dividido em oito ecorregiões com base na sua composição florística e apresentadas a seguir (VELLOSO *et al.* 2002). Os de origem sedimentar compreendem: (I)

Complexo de Campo Maior, localizado no estado do Piauí o qual, em comparação com as outras fitofisionomias, apresenta uma média de chuvas relativamente maior. Devido à capacidade da retenção de água nos solos sedimentares, a vegetação predominante nessa área é comumente herbácea e característica de regiões de ecótono. (II) O Complexo Ibiapaba-Araripe localizado entre os estados do Ceará, Pernambuco e Piauí, o qual apresenta um relevo altiplano com cerca de 700 m de altitude, sendo a região dominada por latossolos arenosos. A vegetação no topo é do tipo cerradão, com a presença de florestas pluviais nas encostas. (III) O Raso da Catarina, que compreende uma região bastante seca, distribuindo-se longitudinalmente entre os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. É composto por uma bacia sedimentar com uma pequena disponibilidade de água em sua superfície, exceto na área de cânions. (IV) A região das Dunas do São Francisco, compreendendo a formações arenosas de origem eólica, compostas por areias quartzosas de fertilidade muito baixa. A vegetação se agrupa em moitas arbustivas, ocorrendo também bromélias, como a macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex. Schult. f.)

Nos terrenos de origem granítica/gnáissica observamos a Depressão Setentrional (V) localizada nos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Paraíba, a qual se delimita com o complexo Ibiapaba-Araripe e Planalto da Borborema. Esta é a maior ecorregião da Caatinga e abrange uma planície baixa, de solos rasos e pedregosos, com origem cristalina e susceptível a erosões, além de uma alta irregularidade pluviométrica. A vegetação é a mais característica da Caatinga, com elementos de porte arbustivo e arbóreo, porém de composição florística diferente da Depressão Meridional. Por sua vez, o Planalto da Borborema (VI) é uma importante formação a leste do domínio das Caatingas, devido a um relevo de altitude que reduz a precipitação na depressão sertaneja e sua ligação com a Floresta Atlântica. Este se estende latitudinalmente entre os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas. São característicos dessa ecorregião os brejos de altitude, classificados na Floresta Atlântica *sensu lato*, como regiões de grande diversidade florística, clima e solos diferenciados. A vegetação a barlavento é característica de zonas úmidas, na parte ocidental, predomina uma vegetação mais seca.

Além desses, a Depressão Sertaneja Meridional (VII) se estende como um mosaico entre os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, e se limita com o Cerrado mineiro com vegetação fitofisionomicamente semelhante à Depressão Sertaneja

Setentrional. Na porção central desta localiza-se o Complexo da Chapada Diamantina (VIII), inteiramente no estado da Bahia e em sua maioria formada por relevos acima de 500 m de altitude. Possui uma flora diferenciada com alto índice de endemismo.

O domínio das caatingas em si não compreende a uma composição isolada, mas a um núcleo bastante diverso que se relaciona com os ambientes ao seu redor. Há duas proposições para o histórico de expansão e retração das floras das SDTF do continente americano, a primeira delas proposta (PRADO & GIBBS, 1993) sugere que a atual conformação disjunta e fragmentada da vegetação fornece vestígios de uma vegetação contínua do núcleo da Caatinga no Nordeste até o Norte da Argentina, que se contraiu após o período de glaciações, restando dois núcleos disjuntos no Nordeste Brasileiro e a região de Misiones na Argentina. A outra hipótese, que é conhecida como hipótese Amazônica, sugere a partir de dados fundamentados em comparações de vegetação que as SDTFs avançaram sobre a Amazônia durante os períodos de glaciação do Pleistoceno, atingindo por fim a conformação que apresenta hoje (PENNINGTON *et al.*, 2000). Estudos fundamentados na distribuição atual das SDTF levaram a sugerir uma maior estabilidade dos atuais núcleos de floresta tropical semidecidual durante o período pleistocênico, refutando a hipótese Amazônica (WERNECK *et al.*, 2011) Entretanto, o trabalho discute que maiores expansões da SDTF devem ter ocorrido mais recentemente durante o Holoceno, o que justifica as similaridades florísticas dos núcleos de SDTF. Este ainda sugere que dispersão em longa distância deve ter sido responsável pela presença de elementos nas regiões disjuntas de SDTFs. No entanto, estudos fundamentados em modelagem de nicho incluindo dados obtidos da distribuição de 14 espécies de plantas, comparados com modelos paleoclimáticos de circulação atmosfera-oceano, corroboram com os dois modelos, com uma sobreposição amazônica de por SDF e uma expansão para sul ligando os atuais núcleos de SDTF (COLLEVATTI *et al.*, 2013). Ambos os estudos de Werneck *et al.* (2011) e Collevatti *et al.* (2013), de certo modo, corroboram o descrito tanto por Prado & Gibbs (1993) como por Pennigton *et al.* (2000), onde misturas das floras tropicais com floras mais xéricas formando novas comunidades também são passíveis de terem ocorrido, o que é suportado por ambos os modelos propostos (WERNECK *et al.*, 2011; COLLEVATTI *et al.*, 2013).

2.3 A Cadeia do Espinhaço e seus Campos Rupestres

A Cadeia do Espinhaço, assim denominada, corresponde a uma cordilheira de remanescentes rochosos distribuídos disjuntamente entre os estados da Bahia e Minas Gerais a uma altitude média de 1000 – 1200 metros (GONTIJO *et al.*, 2008). Várias serras são tratadas como pertencentes ao complexo da “cadeia do espinhaço”, que tem esse nome graças à sua conformação longitudinal que lembra a forma e uma espinha dorsal (GONTIJO *et al.*, 2008). Dentre as formações geológicas que a compõem, podemos enumerar o Planalto da Diamantina, a Serra do Cabral, Serra de Grão Mogol, Serra do Cipó, Serra da Canastra em Minas Gerais, o Pico das Almas, o Parque Nacional da Chapada Diamantina e o complexo de Campo Maior na Bahia (GONTIJO *et al.*, 2008; ALVES & KOLBEK, 2010).

De um modo geral esse domínio apresenta uma comunidade de plantas adaptado às diferentes condições que cada ambiente proporciona (RAPINI *et al.*, 2008). Em vista da diversidade de ambientes, a Cadeia do Espinhaço apresenta uma grande quantidade de endemismos vegetais e animais (RAPINI *et al.* 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2008) e compreende por si só uma infinidade de ambientes. Sabe-se que, pelo menos, em sua porção mineira, cada região apresenta uma grande quantidade de endemismos, relacionados com características edafo-climáticas e atitudes diferenciadas em cada porção do espinhaço (ALVES & KOLBEK, 2010; ECHTERNACHT *et al.*, 2011). Tal padrão de distribuição de diversidade foi considerado similar ao observado também para Bromeliaceae (VERSIEUX & WENDT, 2007).

O tipo de vegetação predominante na Cadeia do Espinhaço é comumente tratada como “campo rupestre”, uma vez que suas espécies componentes apresentam várias adaptações ao terreno rochoso, típico da região. Porém, os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço também apresentam elementos de Caatinga, Mata Atlântica e principalmente cerrado (ALVES & KOLBEK, 2010). Todavia, o termo “campo rupestre” não se detém apenas ao complexo da Cadeia do Espinhaço, sendo que os mesmos autores argumentam que outras formações, principalmente aquelas associadas ao cerrado (como a Serra Dourada em Goiás) fazem parte desse padrão de vegetação.

3. *Inselbergs* – Um Modelo de Ilhas Terrestres

Inselbergs são afloramentos rochosos cristalinos encontrados em regiões tropicais e subtropicais, sendo caracterizados por microclimas específicos onde é encontrada uma biodiversidade adaptada a ambientes xéricos, compreendendo no Brasil ambientes que incluem grupos de plantas como as Bromeliaceae, Cactaceae e Velloziaceae, onde apresentam certa diversificação (POREMBSKI *et al.*, 1998). Essas formações são tratadas do ponto de vista ecológico como ilhas de vegetação terrestre (POREMBSKI, 2007).

O termo “*inselbergs*” foi introduzido pelo geólogo Bornhardt ao se referir às montanhas monolíticas ou grupos de montanhas que surgem abruptamente em um terreno plano. Muito se discute na literatura em relação à definição de *inselbergs*. Aqui definimos *inselberg* a partir de uma definição ecológica, ou seja, ilhas de afloramentos rochosos que compreendem uma flora adaptada localizada em uma matriz e circundada por uma flora característica, diferente da flora do *inselberg* (POREMBSKI & BARTHLOT, 2000)

Fatores edafo-climáticos fazem com que os *inselbergs* sejam tratados como pequenos desertos microclimáticos, onde as condições de temperatura são mais altas que o entorno e disponibilidade de água e solo sobre a rocha são mínimas (GOMES & ALVES, 2009). Dessa maneira, a flora de *inselbergs* é altamente adaptada e diferenciada da flora circundante. Também estão presentes nesse tipo de vegetação algumas espécies de cianobactérias, briófitas e várias plantas vasculares, principalmente monocotiledôneas (POREMBSKI, 2007). A similaridade florística de *inselbergs* da Caatinga pode estar associada ao clima predominante em cada área, bem como em nível de atividade antrópica em cada afloramento, o que pode resultar em semelhanças entre as floras dessas formações (FRANÇA *et al.*, 1997; PORTO *et al.*, 2008).

No Brasil *inselbergs* de algumas regiões no domínio da Floresta Atlântica se assemelham em sua composição florística às regiões de campos rupestres do Brasil central, que compreende principalmente a formação da Cadeia do Espinhaço, compartilhando inclusive algumas espécies dos gêneros *Encholirium*, *Trileps* e *Vellozia*. A cadeia do espinhaço tem sido um importante centro de diversidade e irradiação desses grupos de espécies (POREMBSKI *et al.*, 1998; VERSIEUX *et al.*, 2008).

Uma das principais adaptações apresentadas pelas plantas de *inselbergs* é a propagação vegetativa, a qual representa uma vantagem em tais ambientes por necessitar apenas de uma única colonização para que grandes populações possam se estabelecer em uma determinada localidade (POREMBSKI & BARTHLOT, 2000). Por outro lado, a reprodução sexual pode ser um risco, pois o recrutamento de novos indivíduos via sementes pode apresentar grande mortalidade face às condições ambientais severas (POREMBNSKI *et al.*, 1998). Ainda em relação às adaptações que esses vegetais apresentam para esses ambientes, a suculência, ou estruturas anatômicas capazes de prover reservas de água para suportar a limitação hídrica, são comuns. Algumas possuem como estratégia o fato de estarem presentes apenas no período chuvoso, mantendo um banco de sementes na estação seca (POREMBSKI *et al.*, 1998; GOMES & ALVES, 2009).

Em *inselbergs* da Caatinga, *E. spectabile* é uma espécie que visualmente caracteriza esse tipo de ambiente, formando ilhas de vegetação, muitas vezes por reprodução vegetativa, especialmente na zona até os 800 m de altitude. A distribuição de espécies nas ilhas de vegetação está associada a características como tamanho da ilha, textura do solo, pH, profundidade e matéria orgânica acumulada. Quanto à similaridade, os estudos mostram que a distância geográfica está diretamente relacionada com a composição florística de cada afloramento, porém a flora é bastante diferente da vegetação circundante (GOMES & ALVES, 2009).

4. Marcadores Moleculares e Genética de Populações em Bromeliaceae

4.1 Principais Marcadores Utilizados em Genética de Populações

Diversas técnicas moleculares vêm sendo utilizadas no decorrer dos anos com a finalidade de averiguar as relações de diversidade e estrutura genética entre populações naturais. (NYBOM, 2004; NYBOM *et al.*, 2014). Por exemplo, em estudos populacionais marcadores codominantes (como isoenzimas e microssatélites) podem gerar informações quanto à diversidade genética associada a diferenças de heterozigosidade, permitindo estimar as frequências em gerações futuras. Por sua vez, marcadores dominantes (como DAF (*DNA Amplification fingerprinting* – Impressão Genômica de DNA), RAPD (*Random*

Amplified Polymorphic DNA – Amplificação Randômica de DNA Polimórfico), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* – Sequências Intercaladas entre Repetições Simples) não permitem a identificação dos níveis de heterozigosidade, embora sejam bastante eficientes quando utilizados para estimativas de índices de diversidade genética associada a análises populacionais. Além disso, permitem uma maior cobertura do genoma, amplificando regiões gênicas e não gênicas. Além disso, sua aplicação é possível mesmo sem conhecimento genético prévio sobre o genoma de uma dada espécie (NYBOM, 2004).

Entre os marcadores codominantes, um dos marcadores mais utilizados na atualidade são os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*; Polimorfismos de Sítio Único), que correspondem a polimorfismos em uma única base de DNA. São marcadores normalmente bialélicos e que apresentam uma alta frequência nos genomas, havendo cerca de dois SNPs em cada 500 pares de bases de DNA genômico (VGINAL *et al.*, 2002; DE WIT *et al.*, 2015) Além desses, novas tecnologias de sequenciamento de alta performance proporcionam a identificação de grandes quantidades de marcadores SNP, como RNA-Seq e Pool-Seq, os quais estão revolucionando a atualidade da genética de populações (SCHLÖTTERER *et al.*, 2014; DE WIT *et al.*, 2015).

4.1.1 Marcadores Codominantes - Microssatélites

Os marcadores mais aplicados para análises de genética populacional têm sido de longe os SSRs (*Simple Sequence Repeats* – Repetições de Sequências Simples), ou simplesmente microssatélites. Estes marcadores são específicos por amplificar regiões de sequências repetidas em *tandem* com repetições de um a seis nucleotídeos, tratando-se (em sua maioria) de regiões de evolução neutra, menos influenciadas pela seleção natural. Microssatélites adicionalmente são multialélicos e normalmente apresentam alta heterozigosidade, altos níveis de polimorfismo e excelente reprodutibilidade (NYBON, 2004; LIMA, 2007; NYBOM *et al.*, 2014). Sua aplicação tem sido para estudos em populações naturais de plantas na identificação de diferentes genótipos, diversidade e estrutura genética populacional, hibridização, introgressão e poliploidia, além de especiação, sistemática e filogeografia (NYBOM *et al.*, 2014). Esses marcadores apresentam ainda a possibilidade de serem obtidos para regiões nucleares ou organelares,

permitindo assim uma comparação entre regiões com padrões de herança e histórias evolutivas diferentes (NYBOM *et al.*, 2014).

Quanto à sua localização e estrutura, essas sequências são presentes em repetições de di- e tri-nucleotídeos localizadas em regiões codificantes, bem como repetições maiores em regiões não codificantes (LI *et al.*, 2002). A neutralidade dos SSR vem sendo questionada quando são verificadas diferenças em tamanho entre procariotos e eucariotos, o que sugere que esse tipo de sequência promove vantagens adaptativas a mudanças bruscas de ambientes, observando-se também semelhanças entre táxons próximos permitindo a transferabilidade de *primers* entre espécies (LI *et al.*, 2002).

Há evidências de que os SSR têm funções na organização da cromatina, podendo formar alças e ganchos que influenciam na organização cromossômica e na estrutura da cromatina, estando fortemente relacionados com a organização dos centrômeros e telômeros. Além disso, apresentam funções na regulação em processos como replicação e recombinação do DNA e regulação do ciclo celular (LI *et al.*, 2002).

Microsatélites também podem ser obtidos a partir de análises *in silico* de ESTs (*Expressed Sequence Tags* – Etiquetas de Sequências Expressas), sendo por isso denominados ETS-SSR. Podem ser facilmente identificados em sequências existentes, o que reduz os custos na sua identificação e o desenho de *primers*. Por serem ligados a uma sequência transcrita (geralmente genes), podem conter alguma função de interesse, esperando-se nesse caso uma alta transferabilidade para espécies próximas, uma vez que se tratam de regiões mais conservadas (NYBOM *et al.*, 2014).

4.1.2. Estudos de Genética Populacional em Bromeliaceae e suas contribuições para o conhecimento da biologia do grupo.

A estrutura genética e os níveis de diversidade populacional de Bromeliaceae têm sido avaliados através de vários marcadores moleculares ao longo dos anos, como aloenzimas, AFLP e principalmente marcadores microsatélites de natureza nuclear e cloroplastidial, permitindo a avaliação de aspectos diversos, mas sempre correlacionando

efeitos como a ocorrência de endocruzamentos e a identificação de limites interespecíficos (e.g. IZQUIERDO & PIÑERO, 2000; SGORBATI *et al.*, 2004; PALMA-SILVA *et al.*, 2009, PALMA-SILVA *et al.*, 2011).

Tais marcadores foram aplicados em espécies ameaçadas ou com distribuição muito limitada com o objetivo principal de fornecer subsídios para sua conservação. Um desses estudos foi conduzido com *Aechmea tuitensis* Mangaña ex. Lott., que apresenta endemismo no México. Foram analisadas nove populações através de marcadores de aloenzimas, verificando-se excesso de heterozigotos em algumas localidades, característica não esperada espécies de distribuição restrita (IZQUIERDO & PIÑERO, 2000), nas quais normalmente se espera erosão genética devido à ocorrência de endocruzamentos (KELLER & WALLER, 2002). Desta forma, delineou-se claramente uma estrutura genética bastante coesa em nível interpopulacional, com fluxo gênico entre as populações.

Resultados similares foram observados na análise de populações *Aechmea winkleri* Reitz analisadas como o auxílio de marcadores microssatélites, estas populações isoladas em fragmentos de Floresta Atlântica no Sul do Brasil, apresentaram altas porcentagens de heterozigotos (GOETZE *et al.*, 2015).

Estratégias de conservação podem ser sugeridas a partir dos dados gerados por esses trabalhos, sendo a perda de habitat o principal fator que ameaça as espécies analisadas. A eliminação de microhabitats de espécies que dependem de forófitos específicos apresentam-se como uma séria ameaça, como no caso de *Tillandsia achyrostachis* Moor & Baker, onde as seis populações avaliadas a partir de 16 *loci* aloenzimáticos apresentaram moderados valores de diversidade genética. A partir dos resultados obtidos para essa espécie argumenta-se que a diversidade observada seja decorrente de altos níveis de endocruzamento, como resultado de reprodução clonal, propiciando uma homogeneização das frequências genéticas entre as populações. Tais fatores agravam mais ainda as ameaças de extinção da espécie, merecendo assim atenção quanto à proteção dos forófitos, e, portanto dos ambientes em que a espécie ocorre (GONZALES & ASTORGA, 2004).

Isolamento de populações de espécies resultam em desvios no equilíbrio genético esperado (Hardy – Weinberg) e um dos desequilíbrios mais comuns é a depressão endogâmica (KELLER & WALLER, 2002). Efeitos de endogamia foram visualizados

também em *A. winkleri* como potencial resultado do isolamento devido à fragmentação de habitat (GOETZE *et al.*, 2015).

Taxas de endocruzamentos e reprodução clonal são características que podem reduzir a diversidade genética das populações, como observado a partir dos estudos genéticos populacionais em espécies de *Encholirium* endêmicas da Cadeia do Espinhaço, cujos padrões de RAPD indicaram pouca formação de clones, uma vez que cada indivíduo apresentou um perfil distinto de RAPD, com poucas exceções (CAVALLARI *et al.*, 2006). Pouca ou nenhuma reprodução clonal também foi atribuída à espécie *E. horridum*, exclusiva de afloramentos de Floresta Atlântica. A partir de análises com marcadores microsatélites verificaram-se índices de reprodução clonal próximos de zero, identificando-se apenas dois clones na população (HMELJEVISKY *et al.*, 2015).

Outro estudo com *Puya raimondii* Harms também indicou grande ocorrência de reprodução endogâmica, com baixas taxas de diversidade (SGORBATI *et al.*, 2004). Apesar disso, esse tipo de reprodução parece ser intrínseco de cada espécie, uma vez que estudos com espécies de *Alcantarea* suportados por análises com microsatélites nucleares apontaram para taxas significativas de reprodução clonal para *A. glaziouana* e *A. regina*. Vale ressaltar que o mesmo estudo propôs que os valores evidenciados por microsatélites podem estar relacionados à geitonogamia, considerados mais prováveis que a reprodução clonal (BARBARÁ *et al.*, 2009). No mesmo gênero, nenhuma reprodução clonal foi encontrada para *A. imperialis* Carrière (Harms) e *A. geniculata* (Wawra) J.R. Grant.

A depressão endogâmica tem por característica o aumento da proporção de homozigotos nas populações, tratando-se de um padrão verificado para várias espécies estudadas como auxílio de microsatélites nucleares. Observou-se um decréscimo nos valores de heterozigosidade averiguados a partir de marcadores microsatélites, de acordo com o ambiente em que as espécies ocorriam, bem como de acordo com fatores biogeográficos. Esse foi o caso de *Pitcairnia geyskesii* L.B.Sm. que apresentou um decréscimo gradativo de diversidade no sentido de Norte para Sul na Guiana Francesa (BOISELLIER-DUBAYLE *et al.*, 2010). *Vriesea minarum* de forma similar apresentou um padrão de distribuição da diversidade relacionado com a bacia hidrográfica de ocorrência das populações (LAVOR *et al.*, 2014). Tais fatores tendem a ser explicados a partir de flutuações na ocorrência das espécies, onde teoricamente teriam maior diversidade genética

nos seus centros de origem e após rápidas expansões como no período pleistocênico, quando passaram a ocupar novas áreas, com um efeito fundador contínuo que reduziu a diversidade genética (HEWITT, 2000). O gradiente geográfico aparenta ser limitante no acúmulo de diversidade também para outras espécies restritas a inselbergs como *Alcantarea* spp., sendo os maiores níveis de diversidade genética encontrados em populações costeiras ao passo que populações mais continentais apresentaram os menores valores (BARBARÁ *et al.*, 2007).

A observação de estruturação genética associada a determinados padrões geográficos aparenta ter sido importante para a evolução de Bromeliaceae, e vem sendo observada em diversas análises, com ênfase para populações de inselbergs. Por exemplo, afloramentos rochosos do Rio de Janeiro apresentam populações com um claro padrão geográfico e com fluxo gênico limitado entre rochedos, ocorrendo também hibridização e introgressão com fluxo gênico entre espécies próximas ocorrentes em um mesmo inselberg (PALMA-SILVA *et al.*, 2011). Padrões geográficos na estrutura genética populacional podem resultar de flutuações populacionais no período pleistocênico, como discutido para *Vriesea gigantea* Gaudich. Populações dessa espécie estudadas no Sul-Sudeste do Brasil através de marcadores microssatélites nucleares e cloroplastidiais apresentaram um decréscimo na diversidade genética de norte para sul e isolamento populacional de populações ao norte (PALMA-SILVA *et al.*, 2009).

De forma distinta, quebras que seriam esperadas no fluxo gênico devido a flutuações de flora no período pleistocênico não condizem com o padrão de estrutura genética de *P. geyskesii* LB.Sm. Desta forma, as populações dessa espécie apresentam forte diferenciação genética entre si com alta probabilidade de isolamento por distância entre arquipélagos de inselbergs (BOISSELIER-DUBAYLE *et al.*, 2010).

O fluxo gênico entre inselbergs ou entre populações reflete, de um modo geral, efeitos reprodutivos, como polinização e dispersão de sementes, quando não estão relacionados a efeitos estocásticos maiores. Um sistema reprodutivo fundamentado em autofertilização e fecundação cruzada influencia o sucesso evolutivo de algumas espécies de bromélias, como constatado em estudos de ecologia e confirmado a partir de estudos de genética de populações, com identificação de barreiras pré e pós-zigóticas, bem como de hibridização entre espécies (WENDT *et al.*, 2001, 2002, PALMA-SILVA *et al.*, 2015).

Análises com populações de *Alcantarea* indicaram que a penetrância da polinização cruzada é maior que da autofertilização (MARTINELLI, 1994 *apud* BARBARÀ *et al.*, 2009). Isto corrobora com o observado por marcadores genéticos nucleares em *A. imperialis* e *A. regina*, onde baixos níveis de endocruzamento sugeriram a ocorrência de fecundação aleatória entre indivíduos diferentes (BARBARÁ *et al.*, 2007, 2008, 2009). Entretanto *A. glaziouana* apresenta distribuição mais restrita e níveis maiores de endocruzamento, compatível com uma preferência pela autofecundação (BARBARÁ *et al.*, 2008). Apesar desses resultados, a fecundação entre parentes próximos de uma mesma população deve ocorrer em maior frequência que a autofertilização, o que tende a aumentar os efeitos da endogamia (BARBARÁ *et al.*, 2009).

Naturalmente o sucesso do fluxo gênico também está associado à eficiência dos polinizadores. Em *E. horridum* marcadores microssatélites nucleares, associados a análises de estrutura genética espacial, apontaram para polinização entre indivíduos próximos e autofecundação, sendo este tipo de reprodução responsável por 80% da prole, ao passo que 20% dos cruzamentos seriam originários de fecundação cruzada, sugerindo pouca eficiência dos polinizadores (HELMJEVSKY *et al.*, 2015). Tais estudos com *Alcantarea* e *Encholirium* apontaram também para pouca eficiência na dispersão, que em ambos os casos é feita pelo vento (BARBARÁ *et al.*, 2008, HELMJEVSKY *et al.*, 2015).

Há ainda em Bromeliaceae casos como o de *Puya raimondii* Harms que apresentou altos níveis de endocruzamento em populações estudadas com o auxílio de marcadores RAPD e AFLP. Esta espécie aparenta produzir uma grande quantidade de sementes apenas por autogamia, sendo 96% delas oriundas de autofertilização (SGORBARTI *et al.*, 2004). A autofecundação apresenta um papel importante na especiação, impedindo a introgressão de genes de *P. albiflos* em *P. staminea*, em um complexo sistema de fluxo gênico interespecífico estudado em inselbergs costeiros no Rio de Janeiro (PALMA-SILVA *et al.*, 2011).

As populações estudadas por Palma-Silva *et al.* (2009) foram analisadas do ponto de vista reprodutivo e apresentaram um sistema reprodutivo misto com a presença de autoincompatibilidade críptica, onde ocorre o crescimento diferencial entre pólen da mesma planta ou de plantas diferentes (PAGGI *et al.*, 2015). Para *V. gigantea* a autopolinização

aparenta ter um papel mais importante nas frequências de endocruzamentos que a polinização entre populações próximas (PAGGI *et al.*, 2015).

5. Referências Bibliográficas

- AGUIRRE-SANTORO, J et al. Is *Ronnbergia* (Bromeliaceae, Bromelioideae) a geographically disjunct genus? Evidence from morphology and chloroplast DNA sequence data. **Phytotaxa**, v. 219, n. 3, p. 261-275, 2015.
- ALCOFORADO-FILHO, F. G.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RODAL, M. J. N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifolia espinhosa arbórea em Caruaru, Pernambuco. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, 2, p. 287 –303, 2003.
- ALVES, R. J. V.; KOLBEK, J. Can campo rupestre vegetation be floristically delimited based on vascular plant genera? **Plant Ecology**, v. 207, n. 1, p. 67–79, 2010.
- APGIII. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105 – 121, 2009.
- BARACHO, G. Revisão do gênero *Hohenbergia* sugb. *Hohenbergia*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- BARBARÁ, T. et al. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glazioviana*, *A. regina*, *a. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae), **Annals of Botany**, v. 103, 1, p. 65 – 77, 2009.
- BARBARÁ, T. et al. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glazioviana* and *A. regina* (Bromeliaceae), **Heredity**, v. 101, p. 285 – 296, 2008.
- BARBARÁ, T. et al., C. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae), *Molecular Ecology*, v.16, p. 1981 – 1992, 2007.

- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, 4, p.431 – 439, 2002.
- BARFUSS, M. H. J. et al. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**. v.92, 2, p. 337–351, 2005.
- BELLINTANI, M. C.; DE A. ASSIS, J. G.; COTIAS DE OLIVEIRA, A. L. P. Chromosomal evolution of Bromeliaceae. **Cytologia**, v. 70, n. 2, p. 129-133, 2005.
- BENEVIDES, D. S. et al. Estudo da flora herbácea da caatinga no município de Caraúbas no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Verde**, v.2, 1, p. 33–44, 2007.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, New York, New York, USA.
- BOISSELIER-DUBAYLE, M. et al. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana – a test of the forest refuge hypothesis. **Ecography**, v.33, p.175 – 184, 2010.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, 2008.
- CAVALLARI, M. M. Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba- SP, 2004.
- CAVALLARI, M. M. et al. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, p. 4357 – 4373, 2006.
- CEITA, G.O. et al. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, p. 189–193, 2008.
- CHEW, T.; LUNA, E.; GONZÁLES, D. Phylogenetic Relationships of the Pseudobulbus *Tillandsia* species (Bromeliaceae) Inferred from Cladistic Analysis of ITS 2, 5.8S Ribosomal RNA Gene, and ETS Sequences. **Systematic Botany**, v.35, 1, p.86 – 95, 2010.

- CHRISTIANINI, A. V.; FORZZA, R. C.; BUZATO, S. Divergence on floral traits and vertebrate pollinators of two endemic *Encholirium* bromeliads. **Plant Biology**, v. 15, n. 2, p. 360–368, 2013.
- COFFANI-NUNES, J. V. Revisão Taxonômica e Filogenia de *Portea* Brong. ex K. Koch (Bromelioideae - Bromeliaceae). Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- COGLIATTI-CARVALHO, L. et al. Bromeliaceae species from coastal restinga habitats, Brazilian states of Rio de Janeiro, Espírito Santo, and Bahia. **Check List**, v. 4, n. 3, p. 234-239, 2008.
- COLLEVATTI, R. G. et al. Drawbacks to palaeodistribution modeling: the case of South American seasonally dry forests. **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 2, p. 345-358, 2013.
- COLLI, G. R. et al. A fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: uma síntese. In: Denise Marçal Rambaldi; Daniela América Suarez de Oliveira. (Org.). Fragmentação de Ecossistemas. Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2003, p. 317-324.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P. et al. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, 1, 173 – 177, 2000.
- DA SILVA OLIVEIRA, E. et al. Checklist of the flora of the Restingas State of Sergipe, Northeast Brazil. **Check List**, v. 10, n. 3, p. 529-549, 2014.
- DE WIT, P.; PESPENI, M. H. & PALUMBI, S. R. SNP genotyping and population genomics from expressed sequences - current advances and future possibilities. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 10, p. n/a–n/a, 2015.
- ECHTERNACHT, L. et al. Areas of endemism in the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 9, p. 782–791, 2011.
- EVANS, T. M. et al. Phylogenetic Relationships in Bromeliaceae Subfamily Bromelioideae based on Chloroplast DNA Sequence Data. **Systematic Botany**, v. 40, n. 1, p. 116–128, 2015.

- FORZZA, R. C. Revisão taxonômica de *Encholorium* Mart . ex Schult . & Schult . F . (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). **Boletim de Botanica da Universidade de São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 1–49, 2005.
- FORZZA, R. C.; LEME, E. M. C. Three new species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from eastern Brazil. **Phytotaxa**. v. 227, n. 1, p. 13–24, 2015.
- FORZZA, R.C. et al. *Bromeliaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6096>>. Acesso em: 21 Ago. 2014
- FRANÇA, F.; MELO, E.; SANTOS, C. C. Flora de *inselbergs* da região de milagres, Bahia, Brasil: I. Caracterização da vegetação e lista de espécies de dois *inselbergs*. **Sitientibus**, v. 17, p. 163 – 184, 1997.
- GALINDO-LEAL, C. G. & CÂMARA, I. D. Mata Atlântica Biodiversidade, Ameaças Perspectivas. *Conservation International*, Belo Horizonte, 2005.
- GITAÍ, J. et al. Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, p. 349–368, 2014.
- GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. **Plant Systematic and Evolution**, v. 253, p. 65 – 80, 2005.
- GIULIETTI, A. A. M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**, p. 48–131, 2004.
- GIULIETTI, A.M., HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L. & VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p. 52-61, 2005.
- GIVNISH, T. J. et al. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American–African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. 4, p. S35–S54, 2004.

- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, 5, p. 1 – 24, 2011.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical Biogeography of Bromeliaceae Inferred From *ndhF* Sequence Data. **Alisio**, v. 23, p. 3 – 26, 2007.
- GIVNISH, T.J et al. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunction in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. **International Journal of Plant Science**, v. 165, p.S35–S54, 2004.
- GOETZE, M. V.; ZANELLA, C. M.; PAGGI, G. M.; BRUXEL, M.; PINHEIRO, F. G.; SAMPAIO, J.; A. T.; PALMA-SILVA, C.; CIDADE, F. W. & BERED, F. Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 58, p. 204–210, 2015.
- GOMES, F.S.; GUEDES, M. L. S. Flora vascular e formas de vida das formações de restinga do litoral norte da Bahia, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 1, n. 1, 2014.
- GOMES, P.; ALVES, M. Floristic and vegetational aspects of an inselberg in the semi-arid region of northeast Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 66, 2, p. 329–346, 2009.
- GONTIJO, B. M. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 7–15, 2008.
- GONZALES-ASTORGA, J. et al. Diversity and Genetic Structure of the Mexican endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachis* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 94, p.545 – 551, 2004.
- GOVAERTS, R.; LUTHER, H.E.; GRANT, J. 2014. World Checklist of Plants: Bromeliaceae. (<http://www.kew.org/wcsp/>). Acessado em: 20 Jul. 2014.
- GRANT, J. R. *An Annotated Catalogue of the Generic Names of the Bromeliaceae*, In: The Marie Selby Botanical Gardens, 1998. **Selbyana**. v. 19. 1, 91-121, 1998
- GUERRA, M. D. F.; SOUZA, M. J. N.; LUSTOSA, J. P. G. O domínio morfoclimático das caatingas: potencialidades naturais e fragilidades ambientais - considerações acerca

- dos sertões do médio Jaguaribe, Ceará. In: Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, Viçosa, MG. XIII SBGFA, 2009.
- HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 907-913, 2000.
- HMELJEVSKI, K.; REIS, M.; FORZZA, R. Patterns of Gene Flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a Monocarpic Species of Bromeliaceae From Brazil. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 1, p. 93–101, 2015.
- IZQUIERDO, L. Y.; PIÑERO, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). **Australian Journal of Botany**, v.48, p.645 – 650, 2000.
- JABAILY, R. S.; SYTSMA, K. Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): Placement, major lineages, and Evolution of Chilean species. **American Journal of Botany**, v. 97, 2, p. 337 – 356, 2010.
- JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, p. 459–473, 2014.
- KAEHLER, M.; VARASSIN, I. G. Polinização em uma comunidade de bromélias em Floresta Atlântica Alto-montana no Estado do Paraná , Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, n. 2, p. 219–228, 2005.
- KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 17, n. 5, p. 230–241, 2002.
- KRAPP, F. et al. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, p. 1-24, 2014.
- LAVOR, P. et al. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaco Range, Brazil. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 7, p. 1167–1175, 2014.
- LEAL, F. C.; LOPES, A. V. & MACHADO, I. C. Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, 3, p.379-389, 2006.

- LEAL, I. R.; DA SILVA, J. M.; TABARELLI, M. & LACHER JR., T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, 1, p.139 – 146, 2005.
- LEITMAN, P. et al. Epiphytic angiosperms in a mountain forest in southern Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 2, p. 1-12, 2014.
- LEMOS, J.R.; RODAL, M.J.N. Fitossociologia do componente lenhoso em um trecho de vegetação de caatinga no Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, p. 23-42, 2002.
- LI, Y. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453 - 2465, 2002.
- LIMA, M. L. A. Mapeamento de QTL Utilizando Microsatélites. In: *A botânica no Brasil. Pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais. 58.º Congresso Nacional de Botânica*. BARBOSA, L. M.; SANTOS-JÚNIOR, N. A. (Ed.). São Paulo, Sociedade Botânica do Brasil, 2007.
- LORENZON, M. C. A.; MATRANGOLO, C. A. R. & SCHÖEREDER, J. H. Flora Visitada Pelas Abelhas Eussociais (Hymenoptera, Apidae) na Serra da Capivara, em Caatinga do Sul do Piauí. **Neotropical Entomology**, v.32, 1, p.027-036, 2003.
- LOUZADA, R. B. et al. Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 77, n. 1, p. 54–64, 2014.
- LUTHER, H. E. An alphabetical list of bromeliad binomials. **Bromeliad Society International**, June, p. 114, 2008.
- MACIEL, J. R.; LOUZADA, R. A new species of *Hohenbergia* (Bromeliaceae) from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 156, n. 1, p. 54–58, 2014.
- MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae Da Mata Atlântica Brasileira: Lista De Espécies, Distribuição E Conservação. **Rodriguésia**, v. 59, p. 209–258, 2008.
- MAYO, S. J. FÉLIX, L. P.; JARDIM, J. G. & CARVALHO, A. M. *Anthurium bromelicola*: a remarkable new species from northeast Brazil. **Aroideana**, v. 23, p. 89-99, 2000.
- MORELLATO, L. P. C. & HADDAD, C. FB. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest1. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 786-792, 2000.

- MORENO, M. R.; NASCIMENTO, M. T.; KURTZ, B. C. Estrutura e composição florística do estrato arbóreo em duas zonas altitudinais na Mata Atlântica de encosta da região do Imbé, RJ. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, 3, p.371 – 386, 2003.
- MORO, M. F. et al. The Role of Edaphic Environment and Climate in Structuring Phylogenetic Pattern in Seasonally Dry Tropical Plant Communities. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119166, 2015.
- MYERS, Norman et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v.13, p.1143 – 1195, 2004.
- NYBOM, H.; WEISING, K.; ROTTER, B. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. **Investigative genetics**, v. 5, n. 1, p. 1, 2014.
- PACIENCIA, M. L. B.; PRADO, J. Efeitos de borda sobre a comunidade de pteridófitas na Mata Atlântica da região de Uma, Sul da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, 4, p.641 – 653, 2004.
- PAGGI, G. M. et al. Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic forest bromeliad. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 211, p. 1–10, 2015.
- PALMA-SILVA, C. et al. Mating system variation and assortative mating of sympatric bromeliads (*Pitcairnia* spp.) endemic to neotropical inselbergs. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 5, p. 758-764, 2015.
- PALMA-SILVA, C. et al. Range-wide patterns of nuclear chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, v. 1, p. 1 – 10, 2009.
- PALMA-SILVA, C. et al. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 3185 – 3210, 2011.
- PENNINGTON, R. T.; LAVIN, M.; OLIVEIRA, A. Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 40, p. 437–457, 2009.

- PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. E.; PENDRY, C. A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, n. 2, p. 261-273, 2000.
- PINHEIRO, K.; ALVES, M. Espécies arbóreas de uma área de Caatinga no sertão de Pernambuco, Brasil: dados preliminares. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5,2, p. 426-428, 2007.
- PINHEIRO, K.; RODAL, M. J.; ALVES, M. Floristic composition of different soil types in a semi-arid region of Brazil. **Revista Caatinga**, v. 23, 2, p. 68 – 77, 2010.
- POREMBSKI, S. et al. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic Forest. **Diversity and Distributions**, v. 4, p. 107 – 119, 1998.
- POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habit types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, 4, p. 579 – 586, 2007.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. **Plant Ecology**, v. 151, n. 1, p. 19-28, 2000.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. **Harvard Papers in Botany**, p. 175-184, 1999.
- PORTO, P. A. F. et al. Composição florística de um inselbergue no agreste paraibano, município de Esperança, Nordeste Brasileiro. **Revista Caatinga**, v.21, 2, p. 214 – 222, 2008.
- PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 902-927, 1993.
- PROEMBSKI, S.; BARTHLOTT W. *Pitcairnia feliciana*: The only indigenous African bromeliad. **Harvard Papers in Botany**, v.4, p.175 – 184, 1999.
- QUEIROZ, J. A. et al. Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: A bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. **Journal of Arid Environments**, v. 125, p. 21–30, 2016.
- RAMALHO, M.; BATISTA, M. A.; SILVA, M. *Xylocopa (Monoxylocopa) abbreviata* Hurd & Moure (Hymenoptera: Apidae) e *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae):

- Uma Associação Estreita no Semi-Árido do Brasil Tropical. **Neotropical Entomology**, v.33, 4, p. 417 – 425, 2004.
- RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 16–24, 2008.
- RAUH, W. Bromelienstudien XIX. *Trop. Subtrop. Pflanzenwel.*, v.60, p.907-1004, 1987.
- REITZ, R. *Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 1983.
- REX, M. et al. Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.51, 3, p.472-485, 2009.
- RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest : How much is left, and how is the remaining Forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, p. 1143 – 1153, 2009.
- ROMERO, G. Q. et al. Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. **Oecologia**, v162, p. 941 – 949, 2010.
- SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p 559 – 571, 2010.
- SAZIMA, I.; VOGEL, S. & SAZIMA, M. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. **Plant Systematic and Evolution**, v. 168, 167 – 179, 1989.
- SCHLÖTTERER, C. et al. Sequencing pools of individuals mining genome-wide polymorphism data without big funding. **Nature Reviews Genetics**, 2014.
- SCHULTE, K.; BARFUSS, M. H. J.; ZIZKA, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, 327 -339, 2009.
- SGORBATI, S. et al. A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes, **Plant Biology**, v.6, p. 222–230, 2004.
- SILVA, K. A.; ARAÚJO, E. L.; FERRAZ, E. M. N. Estudo florístico do componente herbáceo e relação com solos em áreas de caatinga do embasamento cristalino e

- bacia sedimentar, Petrolândia, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**. v. 23, 1, p. 100-110, 2009.
- SILVESTRO, D.; ZIZKA, G.; SCHULTE, K. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). **Evolution**, v. 68, n. 1, p. 163-175, 2014.
- SIQUEIRA-FILHO, J. A.; LEME, E. M. C. 2006. *Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: Biodiversidade, conservação e suas bromélias*. Andrea Jakobsson Estúdio Editorial Ltda., Rio de Janeiro. 416 p.
- SIQUEIRA-FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. Foral biology of *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. *Bromelia*, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1-4, p. 3-13, 1998.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Flora neotropica monograph no. 14. (Pitcairnioideae)(Bromeliaceae). New York, New York Botanical Garden for Organization for Flora Neotropica, 1974
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Flora neotropica monograph: no. 14, part 3. Bromelioideae (Bromeliaceae). New York, New York Botanical Garden for Organization for Flora Neotropica p. 1493-2142, 1979.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). New York, New York Botanical Garden for Organization for Flora Neotropica ,1977.
- SOUSA, G. M. & WANDERLEY, M. G. L. 2015. Bromeliaceae *In*: PRATA, A.P.N; FARIAS, M.C.V.; LANDIM, M.F. Flora de Sergipe volume 2. Criação Editora, Aracaju, SE.
- SOUSA, L. O. Revisão taxonômica e filogenia do gênero *Lymania* Read.(Bromelioideae–Bromeliaceae). 2004. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 102p.
- TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132–138, 2005.
- TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica Brasileira. *Megadiversidade*, v.1, 1, p.134 - 138, 2005.
- TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. **American Journal of Botany**. v.84, 5, p.664–670, 1997.

- VASCONCELOS, M. F. et al. As aves dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço: diversidade, endemismo e conservação. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 221-241, 2008.
- VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PEREYRN, F. G. C. (eds). 2002. Ecorregiões – Proposta para o bioma Caatinga. Recife: Associação de plantas do Nordeste, 81p.
- VERSIEUX, L. M. et al. Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 177–189, 2012.
- VERSIEUX, L. M.; WENDT, T. Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 11, p. 2989-3009, 2007.
- VERSIEUX, L. M.; WENDT, T; LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. G. L. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v.4, 1 – 2, p. 98 – 110, 2008.
- VIGNAL, A.; MILAN, D. SANCRISTOBAL, M. & EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275 – 305, 2002.
- WAGNER, N. et al. Spatio-temporal evolution of *Fosterella* (Bromeliaceae) in the Central Andean biodiversity hotspot. **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 5, p. 869-880, 2013.
- WANDERLEY, M. G. L.; FORZZA, R. C. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Bromeliaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** v.2, p. 131-139, 2003.
- WANDERLEY, M. G. L.; MOLLO, L. 1992. Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso (São Paulo, Brasil). Bromeliaceae. São Paulo, SP (Brazil). p. 89-140.
- WANDERLEY, M.G. L; MARTINS, S. 2007. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. Vol. 5. Bromeliaceae. São Paulo, Instituto de Botânica de São Paulo, 315p.
- WENDT, T. CANELA, M. B. F.; LEIN, D. E. & RIOS, R. I. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 232, n. 3-4, p. 201-212, 2002.

- WENDT, T.; CANELA, M. B. F.; FARIA, A. P. G. & RIOS, R. I. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 1-12, p. 1760–1767, 2001.
- WERNECK, F. P. et al. Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidences. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 2, p. 272-288, 2011.
- ZIZKA, G. et al. Chilean Bromeliaceae: diversity, distribution and evaluation of conservation status. **Biodiversity and Conservation**, v.18, 9, 2449-2471, 2009.

**CAPÍTULO 2 – Population genetic structure of the rock outcrop species
Encholirium spectabile (Bromeliaceae): Evidence for cryptic speciation.**

Rodrigo C. Gonçalves-Oliveira, Tina Wöhrmann, Ana M. Benko-Iseppon, Florian Krapp,
Marccus Alves, Maria das Graças L. Wanderley and Kurt Weising.

Manuscrito de artigo científico submetido à **American Journal of Botany**.

POPULATION GENETIC STRUCTURE OF THE ROCK OUTCROP SPECIES

***ENCHOLIRIUM SPECTABILE* (BROMELIACEAE): EVIDENCE FOR CRYPTIC SPECIATION¹**

Rodrigo C. Gonçalves-Oliveira^{2,3,4,7}, Tina Wöhrmann⁴, Ana M. Benko-Iseppon^{2,3}, Florian Krapp⁴, Marccus Alves⁵, Maria das Graças L. Wanderley⁶ and Kurt Weising⁴

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CDU, 50.670 – 420, Recife, Brazil

³Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CDU, 50.670 – 420, Recife, PE, Brazil

⁴Systematics and Morphology of Plants, Institute of Biology, University of Kassel, Heinrich-Plett-Str. 40, 34132 Kassel, Germany

⁵Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Laboratório de Morfo-Taxonomia Vegetal, Av. Moraes Rego, s.n., CDU, 50670-930, Recife, PE, Brazil

⁶Instituto de Botânica de São Paulo, Av. Miguel Stéfano, 3687, Água Funda 04301-902, São Paulo, Brazil

⁷**Author for correspondence: rod.biogen@gmail.com**

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge financial support through the PROBRAL program (a joint initiative of CAPES, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel and DAAD, German Academic Exchange Service), especially in what refers to the sandwich research grant for the first author (Process 12429-12-0). Financial support was also obtained from CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development, Brasília, Brazil), and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco). The authors also thank Dr. Bortoleti, Dr. Prata and M.Sc. Espírito Santo for providing the conditions for field work, and Dr. Moeller for her help in the laboratory.

ABSTRACT

- *Premise of the study:* Inselbergs are unique environments and can be considered as terrestrial islands presenting an adapted flora. We performed a population genetic analysis of the epilithic bromeliad *Encholirium spectabile* Mart. ex Schult.f., a dominant species on inselbergs in northeastern Brazil, to compare the genetic diversity and differentiation with the known morphological diversity.
- *Methods:* Nuclear and chloroplast microsatellite markers were used to genotype *E. spectabile* individuals sampled at 20 rock outcrop locations of northeastern Brazil, representing four geographic regions: Sergipe, Northern Espinhaço Range, Borborema Plateau and Southern Caatinga. The data set was analyzed using several statistical programs to evaluate the genetic diversity and genetic structure among populations and regions.
- *Key results:* Considerable levels of genetic diversity were revealed by both nuclear and chloroplast markers. A Bayesian cluster analyses of the nuclear data suggested a high genetic differentiation between two groups ($K = 2$), one containing the individuals from Sergipe and the other one comprising all remaining samples. Consistent with this finding, an AMOVA indicated a strong genetic differentiation between these two groups. The plastid data likewise indicated genetic isolation of populations originating from the Sergipe region, with none of its haplotypes being shared with any other region.
- *Conclusions:* Limited gene flow among populations in general, and the strong genetic differentiation between Sergipe and the remaining regions in particular indicate the occurrence of a cryptic species in *E. spectabile*.

Key words: Caatinga; inselbergs; microsatellites; population genetics.

INTRODUCTION

Inselbergs are isolated rock outcrops that occur in tropical as well as in temperate regions around the world (Porembski and Barthlott, 2000). Edaphic as well as microclimatic conditions on inselbergs strongly differ from those of the surrounding landscape, and only a specialized flora and fauna can survive in these harsh, rupicolous habitats. Because of their geographical and ecological isolation, inselbergs are often considered as so-called ‘terrestrial islands’ (Porembski, 2007; Burke, 2012). Like in oceanic islands, gene flow among conspecific populations on different inselbergs is presumed to be severely hampered. The paucity of gene flow may eventually trigger allopatric speciation, resulting in the formation of local endemics. Given that environmental conditions on inselbergs are extreme, stabilizing selection on morphology may accompany speciation, which may therefore remain cryptic (Bickford et al., 2007).

In the Neotropics, monocotyledonous plants belonging to Bromeliaceae and Velloziaceae are among the most important components of inselberg vegetation (Porembski, 2007). Many members of the almost exclusively Neotropical family of Bromeliaceae have developed key adaptations like leaf succulence, herbivore protection through spiny leaves, and CAM metabolism that allow them to colonize rocky, (semi-) arid environments (Benzing, 2000; Givnish et al., 2014; Silvestro et al., 2014). Previous population genetic studies on bromeliad species from South American inselbergs indicated a considerable extent of genetic structure that was often correlated with ecological and geographical factors (Barbará et al., 2007, 2009; Boisselier-Dubayle et al., 2010; Palma-Silva et al., 2011). As expected for terrestrial islands, genetic differentiation between

individual inselbergs was generally strong, suggesting very low levels of gene flow.

Inselbergs can be found in various Neotropical biomes, including the Atlantic Rainforest, the Cerrado and the Caatinga (Porembski, 2007). The Caatinga domain is the most dominant ecosystem in northeastern Brazil and covers ca. 850.000 km² with a complex composition of many different ecoregions, of which the driest one is the 'Raso da Catarina' located in the center of this domain (Velloso et al., 2002). The Caatinga also comprises one of the largest Seasonal Dry Tropical Forest (SDTF) nuclei in the New World (Prado and Gibbs, 1993; Pennington et al., 2000). It has been proposed that the Caatinga experienced only few fluctuations of its flora during the climatic oscillations of the Pleistocene, exhibiting stable patterns when niche modeling analyses were carried out, considering ecosystem distribution as well as species distribution (Werneck et al., 2011, Collevatti et al., 2013).

Encholirium spectabile Mart. ex Schult.f. (Bromeliaceae; subfamily Pitcairnioideae) is one of the most common and prominent species on inselbergs and other rock outcrops of the Caatinga, at least in terms of biomass and surface covering (Conceição et al., 2007; Gomes and Alves, 2009). The species is endemic to Brazil where it occurs between the third and the twelfth latitude. It has the widest distribution range of any *Encholirium* species and preferentially grows as a lithophyte, or at least closely associated with rocks (Forzza, 2005; Silva et al., 2009). Morphologically, *E. spectabile* shows a considerable diversity regarding various traits, including floral and pedicel bract size, flower size, inflorescence composition and inflorescence ramifications (Forzza, 2005). Variation is mostly continuous, and Forzza (2005) therefore considered *E. spectabile* to represent a polymorphic species complex. The most conspicuous phenotypic variants were found in

populations from the northern portion of the ‘Espinhaço Range’, which is one of the endemism centers for Bromeliaceae as a whole (Versieux et al., 2008). In this area, flowers of *E. spectabile* have short pedicels in contrast to the longer pedicels found in the remaining distribution area of this species (Forzza, 2005).

Like most other *Encholirium* species, *E. spectabile* is mainly pollinated by bats, but hummingbirds and opossums have also been observed as occasional pollinators (Sazima et al., 1989; Queiroz et al., 2016). This mixed pollination mode may play an important role for the genetic structure of this species, because some pollinators may favor geitonogamy more than others, with consequences for the extent of inbreeding and species fitness. Most *Encholirium* species are also able to form clones by vegetative reproduction via stolons (Forzza, 2005).

Only few population genetic studies have so far been conducted on rock outcrop species of the Caatinga (e.g., Pinheiro et al., 2014), and to our knowledge, only two reports so far investigated the genetic diversity and structure of *Encholirium* species. Cavallari et al. (2006) used random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to analyze the population genetics of three endangered taxa (*E. subsecundum* (Baker) Mez, *E. pedicellatum* (Mez) Rauh and *E. biflorum* (Mez) Forzza) and found high levels of gene flow between populations at the intraspecific level. Hmeljevski et al. (2015) used nuclear microsatellite markers to investigate patterns of gene flow within a single population of the monocarpic species *Encholirium horridum* L.B.Sm. in the Brazilian state of Espírito Santo. Paternity analysis and the evaluation of fine-scale spatial genetic structure revealed that pollen dispersal distances were restricted, and clonality proved to be rare. Clonal reproduction may nevertheless be expected for other members of the genus *Encholirium*.

The present work aimed to (1) assess population genetic parameters of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* in northeastern Brazil, (2) compare its genetic diversity and genetic structure with geographical, ecological and morphological patterns and (3) provide some recommendations for defining conservation strategies.

MATERIALS AND METHODS

Sampling—During field expeditions between 2010 and 2011 a total of 234 individuals of *E. spectabile* were sampled from 20 locations (Fig. 1, Table 1). Sampling was conducted in four different Caatinga regions (Northern Espinhaço Range, Southern Caatinga, Borborema Plateau and State of Sergipe). We attempted to cover each of the sampled areas as good as possible. To avoid the collection of clones, only one sample each was taken from clusters of rosettes that grouped closely together. In some of the smaller populations, less than ten plants of putatively non-clonal origin were available, so that overall sample sizes varied from seven to 20 samples per population (Table 1). In the field, fresh leaves were transferred to a small tube containing a sodium chloride saturated aqueous solution of cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) and preserved in this solution until DNA extraction (Rogstad, 1992). Representative individuals were collected as vouchers and were deposited at the Herbario da Universidade Federal de Pernambuco (UFP), Herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE) and Herbario da Universidade Federal de Campina Grande (CSTR) (UFP 63710, UFP 63711, ASE 18748, CSTR 1562, CSTR 1563, CSTR 1564 and CSTR 1565).

The presence of considerable morphological plasticity in *E. spectabile* had already

been emphasized by Forzza (2005). During field work, we also observed some phenotypic variation, especially regarding size of pedicels, size of inflorescences, numbers of flowers, flowering period and degree of inflorescence ramification. Nevertheless, all individuals collected in the current study fitted the description of the species (for a comprehensive review of morphological descriptors see Forzza, 2005).

DNA extraction and microsatellite genotyping— Total DNA was isolated from 100-150 mg of CTAB-preserved leaf tissue, following Benko-Iseppon et al. (2003). DNA concentrations were determined electrophoretically versus known amounts of λ -DNA as standards. A total of eight nuclear DNA markers (anonymous and EST-based microsatellites; hereafter ‘nSSRs’) previously developed in *Ananas comosus* (L.) Merr. (Wöhrmann and Weising, 2011), *Dyckia marnier-lapostollei* L.B.Sm. var. *estevessii* Rauh (Wöhrmann et al., 2013) and *Encholirium horridum* L.B.Sm (Hmeljevksi et al., 2013) were used to genotype the sampled populations of *E. spectabile* (Table 2). PCR assays followed the protocol described by Wöhrmann and Weising (2011). PCR products were electrophoresed and visualized on denaturing 6% polyacrylamide (PAA) gels on an automated sequencer (Li-Cor 4300 IR²) following the procedure described by Wagner et al. (2015).

Four chloroplast microsatellite markers (hereafter ‘cpSSRs’; see Table 3 for locus characteristics) originally developed for *D. marnier-lapostollei* var. *estevessii* by Krapp et al. (2013) and Krapp (2013) were applied in *E. spectabile* following the PCR assay described by Krapp et al. (2012). Electrophoresis on high-resolution PAA gels was conducted in the same way as described above for nSSRs.

Statistical analyses—Raw data matrices containing the allelic information at eight nSSR and four cpSSR loci were double checked for scoring errors. The nSSR amplification at one or more loci repeatedly failed for 38 samples which had to be excluded from the study. All nSSR analyses were therefore conducted with 196 samples.

For the nSSR data set, observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) as well as Wright's inbreeding coefficient (F_{IS}) were estimated with ARLEQUIN (version 3.5.1.3; Excoffier et al., 2005) and GENETIX (version 4.05; Belkhir et al., 2001). The online package GENEPOP (version 1.2; Raymond and Rousset, 1995) was used to perform exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and to test for the presence of null alleles. FSTAT (version 1.2; Goudet, 1995) was used to calculate allelic richness (R_s). Genetic structuring among the 20 populations was analyzed using the Bayesian clustering approach implemented in STRUCTURE (version 2.3.4; Pritchard et al., 2000), assuming an admixture model. For the determination of the most appropriate number of genetic clusters or groups (K -value) the analysis was run for 1,000,000 generations in the burn-in period and for 10,000 generations in the MCMC simulation analyses after burn-in. Ten repetitions for each K ($1 \leq K \leq 20$) were performed and the admixture level for each individual (Q) was also inferred. The best number of genetic clusters was chosen by calculating the ΔK statistic of Evanno et al. (2005), using STRUCTURE HARVESTER (version 0.6.94; Earl and vonHoldt, 2012). Based on the most appropriate number of clusters suggested by Bayesian clustering, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed with ARLEQUIN, considering 10,000 iterations for the permutation test. To test isolation by distance, a Mantel test was also carried out with ARLEQUIN, correlating the pairwise F_{ST}

values with the pairwise geographic distances (in km).

For the cpSSR data, HAPLOTYPE (version 1.05; Eliades and Eliades, 2009) was used to estimate genetic diversity (D_v), haplotype richness (Hrs), number of private alleles (Prv) and polymorphism information content (PIC) per locus. An AMOVA was performed based on the groups suggested by the STRUCTURE analysis of the nSSR data. By running the AMOVA, an overall F_{ST} was calculated and ARLEQUIN was used to determine pairwise F_{ST} values among all populations.

In order to distinguish between pollen and seed dispersal capability, we conducted a pollen flow to seed flow correlation following the approach presented by Ennos (1994).

RESULTS

Genetic diversity— Genetic diversity parameters per nSSR locus and per population are summarized in Tables 2 and 4, respectively. All eight nSSR loci under study proved to be moderately to highly polymorphic and generated a total of 165 alleles across 196 individuals. Per locus, the number of alleles ranged from six to 37 with a mean number of 20.6 alleles (Table 2). Allelic richness ranged from 1.364 to 6.748 with a mean of 4.461. Observed heterozygosity ranged from 0.061 to 0.698 with a mean of 0.394 and expected heterozygosity (H_e) varied between 0.090 and 0.948, resulting in a mean value of 0.662 (Table 2). As indicated by the high F_{IS} values, all loci showed a significant heterozygote deficit and deviation from HWE within populations with $P < 0.005$.

Per population, the total number of alleles across eight loci varied from 19 to 55 with a mean of 35.3, and allelic richness ranged from 2.202 to 4.081 with a mean of 3.123

(Table 4). Observed and expected heterozygosity values per population ranged from 0.397 to 0.768 and from 0.565 to 0.805, respectively, resulting in mean values of 0.497 and 0.657. Significant deviations from HWE in terms of heterozygote deficiency were detected in 14 out of 20 populations (Table 4). We found no evidence for the presence of null alleles within the data set (not shown). All individual plants had a unique multilocus pattern except for SNB5 and SNB6 that proved to be genetically identical. This implies that our sampling strategy successfully avoided the sampling of clones.

All four cpSSR loci were likewise polymorphic, exhibiting from two to six alleles per locus among the 234 analyzed *E. spectabile* plants (Table 3). The combination of alleles altogether resulted in 23 unique haplotypes (hereafter ‘H’) (Appendix S1, see Supplemental Data with the online version of this article). Genetic diversity (D_v) ranged from 0.139 to 0.675 per locus, and PIC values varied from 0.129 to 0.612 (Table 3). Haplotype H17 exhibited the highest frequency as it appeared in 24 individuals, whereas five haplotypes were identified just once within the data set. The haplotype composition of the 20 populations is shown in Fig. 2. Thirteen of the 23 haplotypes were present in only one population each and were therefore considered as private. Populations LAJ, TEX and CAT each harbored two private haplotypes (Table 4 and Appendix S1, see Supplemental Data with the online version of this article). Between one and three haplotypes were found per population, resulting in a haplotype richness (H_{rs}) between 0 and 1.778 (Table 4).

Genetic structure—Bayesian analysis of the nSSR data set with the program STRUCTURE suggested the presence of two clusters ($K = 2$), with some admixture on the individual level (Fig. 3, Appendix S2, see Supplemental Data with the online version of this article). Cluster

1 comprised all populations from the Sergipe region (GAJ, CSF and GLO), whereas cluster 2 included all populations from the remaining regions, i.e. Borborema Plateau, Southern Caatinga and Northern Espinhaço Range (Fig. 3).

The two clusters revealed by STRUCTURE were defined as groups for an AMOVA that was based on either the nSSR or the cpSSR data (Table 5). With the nuclear data set, the highest proportion of genetic variation was found within populations (66.62%), indicating a genetic differentiation mostly between individuals. Nevertheless, a considerable amount of 20.22% of the total variation occurred between the two groups, and only 13.17% were attributable to variation among populations within groups. By contrast, the AMOVA based on cpSSR data suggested that only 9.85% of the total variation resides within populations, 25.63% among the two groups suggested by STRUCTURE, and 64.57% among populations. The overall F_{ST} values suggested by the AMOVA were 0.334 ($P \leq 0.0001$) for nSSR markers, and 0.902 ($P \leq 0.0001$) for cpSSR data, indicating considerable genetic differentiation among populations (Table 5). Pairwise F_{ST} values between populations from different clusters (as suggested by STRUCTURE) were generally higher than those between populations from the same cluster (Fig. 4, Appendix S3, see Supplemental Data with the online version of this article).

Assuming a P -value of 0.0001, no significant correlation between genetic and geographic distances were found by a Mantel test, neither with nSSR data ($r = 0.107998$, $P = 0.0887$), nor with cpSSR data ($r = 0.28084$, $P = 0.00036$). To estimate the relative rates of pollen and seed flow, we used the formula of Ennos (1994) to compare the F_{ST} values revealed by the biparentally inherited nSSR markers with those revealed by the maternally inherited cpSSR markers. In this way, pollen flow was estimated to be 17.12 times more

efficient than seed flow.

DISCUSSION

Genetic diversity—Overall genetic diversity across *E. spectabile* populations proved to be quite high, both in terms of nSSR and cpSSR data (Table 4). This is in accordance with what was found for other *Encholirium* species, i.e., *E. horridum* (Hmeljevski et al., 2015), *E. subsecundum*, *E. biflorum* and *E. pedicellatum* (Cavallari et al., 2006) and seems to reflect the high morphological diversity in the species. Nevertheless, a significant deviation from HWE due to a deficiency of heterozygotes is observed at all nSSR loci and in 14 of 20 populations. Moderate to high F_{IS} values caused by a deficit in heterozygotes have also been revealed in other population genetic studies on bromeliads, including *Alcantarea geniculata* (Warra) J.R.Grant, *A. imperialis* (Carrière) J.R.Grant, (Barbará et al., 2007), *Pitcairnia albiflos* Herb. and *P. staminea* G.Lodd. (Palma-Silva et al., 2011), all from the inselbergs in the Atlantic Rainforest of southeastern Brazil, *Vriesea minarum* L.B.Sm from rock outcrops of the Espinhaço Range in Minas Gerais (Lavor et al., 2014), *Vriesea gigantea* Gaud. from Atlantic Forest fragments along the southeastern Brazilian coast (Palma-Silva et al., 2009) and *Aechmea winkleri* Reitz from an inland Atlantic Forest fragment in Rio Grande do Sul, southern Brazil (Goetze et al., 2015). Such a pattern is usually attributed to effects of inbreeding and limited gene flow among populations, which might be a common theme in bromeliad populations. This is also illustrated by a recent study of Hmeljevski et al. (2015) who found an average pollen flow distance of only 45.5 m by paternity analyses in a single inselberg population of *Encholirium horridum* in the Atlantic Forest of Espírito Santo State in Brazil. Moreover, 80% of the attributed parents of

the genotyped seedlings were from inside the population, and alien pollen contributed to a maximum of 20%.

Genetic structure and gene flow among rock outcrop E. spectabile populations—Our results indicate that all investigated *E. spectabile* populations from different inselbergs were strongly and significantly differentiated from each other (overall $F_{ST} = 0.334$ for nSSRs and 0.902 for cpSSRs). High levels of genetic differentiation among rock outcrop populations were also revealed in other bromeliads from inselbergs, like *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata* (Barbará et al., 2007, 2009), *Pitcairnia geyskesii* L.B.Sm. (Boisselier-Dubayle et al., 2010) and several *Pitcairnia* L'Hér. species from the Brazilian Atlantic Forest (Palma-Silva et al., 2011). The same was also found for other plant taxa like *Epidendrum secundum* L. (Orchidaceae) in northeastern Brazil (Pinheiro et al., 2014) and *Eucalyptus caesia* Benth. (Myrtaceae) in Australia (Byrne and Hopper, 2008). Apparently, genetic isolation is a common feature of plant species living in isolated habitats like the ‘terrestrial islands’ provided by the tops of the inselbergs. The most obvious explanation for these findings is a lack of gene flow via pollen and/or seeds among the isolated rock outcrops that are embedded in a landscape with completely different edaphic and microclimatic conditions. The observation of significant inbreeding coefficients in *E. spectabile* (Table 4) and in other species (see above) is also in accordance with this and may be related to ineffective pollination between regions (see also Hmeljevski et al., 2015).

A Mantel test revealed that there is no obvious correlation between genetic distances (as measured by F_{ST} values) and geographic distances. Especially in widely distributed rock outcrop species, the geographic distance is usually not correlated with the

genetic distance, leading to a limited connectivity between populations (Barbará et al., 2007; Boisselier-Dubayle et al., 2010). Similarly, in a study on four sympatric *Pitcairnia* species collected on close inselbergs, Palma-Silva et al. (2011) found that genetic diversity was not evenly distributed among populations. In the case of *E. spectabile* the sharing between Northern Espinhaço Range and Borborema Plateau is higher. Gene sharing between northern Chapada Diamantina and Borborema Plateau was also detected for *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) (Pinheiro et al., 2014). Chloroplast differentiation between populations was remarkable, exhibiting an overall F_{ST} value of 0.902. More differentiation on chloroplast structure than on nuclear structure is generally expected for species with wind dispersion as *E. spectabile*.

Genetic isolation of E. spectabile populations in the Sergipe region—In our study, the highest genetic differentiation occurred between two clusters detected by the Bayesian STRUCTURE analysis of nSSR data, one formed by the three populations from the Sergipe region (CSF, GLO and GAJ), and the other one comprising all populations from the Northern Espinhaço Range (TAB, LAJ, LBD, FRD and JAC), the Southern Caatinga region (SOB, IFG, BPT and FPL) and the Borborema Plateau (TEX, SNB, QUM, PCV, GUA, BMD, CAT and CUP). This distinction is also supported by a compilation of all pairwise F_{ST} values (Fig. 4) and suggests that gene flow is more restricted between the two clusters than within each cluster. Interestingly, however, the two clusters show no correlation with pedicel size, which is the only clear-cut morphological character in *E. spectabile* that differs among regions. Thus, populations from the Northern Espinhaço Range that have short pedicels cluster together with populations from the Borborema

Plateau and Southern Caatinga region that are characterized by long pedicels in the STRUCTURE analysis.

Presently, we can only speculate on what barriers or other factors may have contributed to the genetic distinctness of the Sergipe region. Given that pollination was estimated here to be approximately 17 times more efficient than seed dispersal, the capacity of pollinators to bridge the distance between populations seems to be of particular importance for the maintenance of gene flow and species cohesion in *E. spectabile*. Gene flow via seeds seems to be negligible, most likely due to the limited flying abilities of wind-dispersed *Encholirium* seeds. Notably, the Sergipe region is located southeast of the very dry ‘Raso da Catarina’ ecoregion which may act as a barrier for pollinators towards the west and the northwest (Appendix S4, see Supplemental Data with the online version of this article). Towards the north, the São Francisco River itself may provide another potential barrier for pollinators (Velloso et al., 2002; Silva et al., 2004; Costa et al., 2015).

Bats are the main pollination vectors for *Encholirium* species (Sazima et al., 1989; Queiroz et al., 2016), albeit other pollinators like bees, opossums and hummingbirds were also observed (Lorenzon et al., 2003; Leal et al., 2006; Siqueira-Filho and Leme, 2006; Queiroz et al., 2016). Since our results highlight the importance of pollination for gene flow in *E. spectabile*, we argue that the very dry habitat provided by the ‘Raso da Catarina’, and possibly also the São Francisco River may have acted as a pollen flow barrier, thereby driving genetic differentiation of the populations located in the Sergipe region. Additionally its ecological as well as geographical isolation may also have caused local selection of peculiar regional pollinator guilds in this mixed pollination system, which could still enhance the genetic separation from populations growing in other areas. Cross-pollination

between *E. spectabile* populations may nevertheless still occur at low frequencies, depending on the distances in a stepping-stone gene flow scenario. Gene flow via seeds, however, seems to be really infrequent between populations.

Evidence for cryptic speciation—The two genetically distinct clusters found in *E. spectabile* are reminiscent of the situation in so-called cryptic species, which have been defined by Bickford et al. (2007) as two or more distinct species that are classified (and hidden) under one species name. Thus, pairs or groups of cryptic species are morphologically highly similar, but can be delimited through the combined evaluation of differences in geography, ecology, DNA markers, and other appropriate characters. Up till now, cryptic species have preferentially been described in certain animal taxa like lizards (Rissler and Apodaca, 2007), frogs (Funk et al., 2012) and butterflies (Bertrand et al., 2014), where morphologically indistinguishable species were shown to be separated by other important characters, like e.g. nonvisual mating signals. Interestingly, cryptic species have often been discovered in extreme environments, at least in animals (Bickford et al., 2007; Pfenninger and Schwenk, 2007), whereas comparatively few studies on cryptic species have yet been performed in higher plants (Grundt et al., 2006, Govindarajulu et al., 2011; Carstens and Satler, 2013).

Genetic isolation of populations plays a key role in allopatric speciation, where two vicariant lineages may differentiate even if their niche remains conserved (Wiens and Graham, 2005). Conservatism in morphological characters between two divergent lineages may be observed if they present any ecological value (Peterson et al., 1999; Wiens and Graham, 2005), e.g. in extreme environments. The tank in bromeliads for example is

considered to be an important adaptation of the core Bromelioideae subfamily which allowed them to succeed as epiphytes and survive in xeric environments (Silvestro et al., 2014). Also Chilean *Puya* Molina species retained ancient morphological features such as flower colour, inflorescence type and scale morphology that may once have been important for the establishment and speciation on the southern border of their distribution in South America (Jabaily and Sytsma, 2010). Both examples refer to sets of characteristics that have remained preserved across species, because they represent important adaptations to survival under extreme environmental conditions.

Taken together, the strong genetic distinction paired with the lack of any apparent morphological differentiation leads us to suggest that the two groups of populations found in *E. spectabile* should be considered as cryptic species. We further assume that these two groups have retained the morphological characters of their progenitors due to adaptation to an extreme environment, where other examples of cryptic speciation in plants have also been detected (e.g. in arctic communities that are characterized by a shortage of water, light, pollinators and other resources; Grundt et al., 2006).

Implications for conservation—For conservation purposes it is clearly recommended that *E. spectabile* should be preserved *in situ* in whatever location, given the high degree of genetic uniqueness of each of the local populations investigated here. Gene flow among populations is apparently low, and each region preserves its own gene pool that might not be available in close populations. Populations of the Sergipe region should in particular be considered for protection because of their genetic distinction, whereas populations from the Northern Espinhaço Range should be preserved to avoid loss of the ‘short pedicels’

morphotype.

LITERATURE CITED

- BARBARÁ, T., G. MARTINELLI, M. F. FAY, S. J. MAYO, AND C. LEXER. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981–1992.
- BARBARÁ, T., G. MARTINELLI, C. PALMA-SILVA, M. F. FAY, S. MAYO, AND C. LEXER. 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.
- BELKHIR K., P. BORSA, L. CHIKHI, N. RAUFASTE, AND F. BONHOMME. 2001. Genetix 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- BENKO-ISEPPON, A. M., P. WINTER, B. HUETTEL, C. STAGINNUS, F. J. MUEHLBAUER, AND G. KAHL. 2003. Molecular markers closely linked to *fusarium* resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 379–386.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, New York.
- BERTRAND, C., D. H. JANZEN, W. HALLWACHS, J. M. BURNS, J. F. GIBSON, S. SHOKRALLA, AND M. HAJIBABAEI. 2014. Mitochondrial and nuclear phylogenetic analysis with

- Sanger and next-generation sequencing shows that, in Area de Conservation Guanacaste, northwestern Costa Rica, the skipper butterfly named *Urbanus belli* (family Hesperiiidae) comprises three morphologically cryptic species. *BMC Evolutionary Biology* 14: 153–171.
- BICKFORD, D., D. J. LOHMAN, N. S. SODHI, P. K. NG, R. MEIER, K. WINKER, K. K. INGRAM, AND I. DAS. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- BOISSELIER-DUBAYLE, M. C., R. LEBLOIS, S. SAMADI, J. LAMBOURDIERE, AND C. SARTHOU. 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.
- BURKE, A. 2012. The effect of altitude on arid inselbergs along a bioclimatic gradient. *Journal of Natural History* 46: 3011–3023.
- BYRNE, M., AND S. D. HOPPER. 2008. Granite outcrops as ancient islands in old landscapes: evidence from the phylogeography and population genetics of *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae) in Western Australia. *Biological Journal of the Linnean Society* 93:177–188.
- CARSTENS, B. C., AND J. D. SATLER. 2013. The carnivorous plant described as *Sarracenia alata* contains two cryptic species. *Biological Journal of the Linnean Society* 109: 737–746.
- CAVALLARI, M. M., R. C. FORZZA, E. A. VEASEY, M. I. ZUCCHI, AND G. C. X. OLIVEIRA. 2006. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and*

- Conservation* 15: 4357–4373.
- CHRISTIANINI, A. V., R. C. FORZZA, AND S. BUZATO. 2013. Divergence on floral traits and vertebrate pollinators of two endemic *Encholirium* bromeliads. *Plant Biology* 15: 360–368.
- COLLEVATTI, R. G., L. C. TERRIBILE, G. OLIVEIRA, M. S. LIMA-RIBEIRO, J. C. NABOUT, T. F. RANGEL, AND J. A. F. DINIZ-FILHO. 2013. Drawbacks to palaeodistribution modelling: the case of South American seasonally dry forests. *Journal of Biogeography* 40: 345–358.
- CONCEIÇÃO, A. A., L. S. FUNCH, AND J. R. PIRANI. 2007. Reproductive phenology, pollination and seed dispersal syndromes on sandstone outcrop vegetation in the "Chapada Diamantina", northeastern Brazil: population and community analyses. *Brazilian Journal of Botany* 30: 475–485.
- COSTA, G. M., D. CARDOSO, L. P. QUEIROZ, AND A. A. CONCEIÇÃO. 2015. Variações locais na riqueza florística em duas ecorregiões de caatinga. *Rodriguésia*. 66: 685–709.
- EARL, D. A., AND B. M. VONHOLDT. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- ELIADES, N.-G., AND D. G. ELIADES. 2009. HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. *Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany*. URL <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.html>
- ENNOS, R. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250–259.

- EVANNO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- FORZZA, R. C. 2005. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex Schult. and Schult.f. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 23: 1–49.
- FUNK, W. C., M. CAMINER, AND S. R. RON. 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 1806–1814.
- GIVNISH, T. J., M. H. J. BARFUSS, B. V. EE, R. RIINA, K. SCHULTE, R. HORRES, P. A. GONSISKA ET AL. 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55–78.
- GOETZE, M., M. V. BÜTTOW, C. M. ZANELLA, G. M. PAGGI, M. BRUXEL, F. G. PINHEIRO ET AL. 2015. Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 58, 204–210.
- GOMES, P., AND M. ALVES. 2009. Floristic and vegetational aspects of an inselberg in the semi-arid region of Northeast Brazil. *Edinburgh Journal of Botany* 66: 329–346.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics.

- Journal of Heredity* 86: 485–486.
- GOVINDARAJULU, R., C. E. HUGHES, AND C. D. BAILEY. 2011. Phylogenetic and population genetic analyses of diploid *Leucaena* (Leguminosae; Mimosoideae) reveal cryptic species diversity and patterns of divergent allopatric speciation. *American Journal of Botany* 98: 2049–2063.
- GRUNDT, H. H., S. KJØLNER, L. BORGÉN, L. H. RIESEBERG, AND C. BROCHMANN. 2006. High biological species diversity in the arctic flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 972–975.
- HMELJEVSKI, K. V., M. B. CIAMPI, C. BALDAUF, M. S. D. REIS, AND R. C. FORZZA. 2013. Development of SSR markers for *Encholirium horridum* (Bromeliaceae) and transferability to other Pitcairnioideae. *Applications in Plant Sciences* 1: 1–4.
- HMELJEVSKI, K. V., M. S. D. REIS, AND R. C. FORZZA. 2015. Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. *Journal of Heredity* 106: 93–101.
- JABAILY, R. S., AND K. J. SYTSMA. 2010. Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): placement, major lineages, and evolution of Chilean species. *American Journal of Botany* 97: 337–356.
- KRAPP, F. 2013. Phylogenie und Evolution der Gattung *Dyckia* (Bromeliaceae). Ph.D. dissertation, University of Kassel, Kassel, Germany.
- KRAPP, F., G. A. S. CRUZ, T. WÖHRMANN, A. M. BENKO-ISEPPON, AND K. WEISING. 2013. A set of variable plastid SSR markers for the genus *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Research in Plant Biology* 3: 18–21.
- KRAPP, F., T. WÖHRMANN, D. S. DE BARROS-PINANGÉ, A. M. BENKO-ISEPPON, B.

- HUETTEL, AND K. WEISING. 2012. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. *American Journal of Botany* 99: e470–e473.
- LAVOR, P., C. VAN DEN BERG, C. M. JACOBI, F. F. CARMO, AND L. M. VERSIEUX. 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101: 1167–1175.
- LEAL, F. C., A. V. LOPES, AND I. C. MACHADO. 2006. Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 379–389.
- LORENZON, M. C., C. A. MATRANGOLO, AND J. H. SCHOEREDER. 2003. Flora visitada pelas abelhas eussociais (Hymenoptera, Apidae) na Serra da Capivara, em Caatinga do Sul do Piauí. *Neotropical Entomology* 32: 27–36.
- PALMA-SILVA, C., C. LEXER, G. M. PAGGI, T. BARBARÁ, F. BERED, AND M. H. BODANESE-ZANETTINI. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), an neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- PALMA-SILVA, C., T. WENDT, F. PINHEIRO, T. BARBARÁ, M. F. FAY, S. COZZOLINO, AND C. LEXER. 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* 20: 3185–3201.
- PENNINGTON, T. R., D. E. PRADO, AND C. A. PENDRY. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27: 261–273.
- PETERSON, A. T., J. SOBERÓN, AND V. SÁNCHEZ-CORDERO. 1999. Conservatism of

- ecological niches in evolutionary time. *Science* 285: 1265–1267.
- PFENNINGER, M., AND K. SCHWENK. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* 7: 121–126.
- PINHEIRO, F., S. COZZOLINO, D. DRAPER, F. DE BARROS, L. P. FÉLIX, M. F. FAY, AND C. PALMA-SILVA. 2014. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. *BMC Evolutionary Biology* 14: 49–64.
- POREMBSKI, S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Brazilian Journal of Botany* 30: 579–586.
- POREMBSKI, S., AND W. BARTHOLOTT. 2000. Biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. Springer, Berlin.
- PRADO, D.E., AND P. E. GIBBS. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 902–927.
- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- QUEIROZ, J. A., Z. G. M. QUIRINO, A. V. LOPES, AND I. C. MACHADO. 2016. Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: A bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. *Journal of Arid Environments* 125: 21–30.
- RAYMOND, M., AND F. ROUSSET. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- RISSLER, L. J., AND J. J. APODACA. 2007. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black

- salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology* 56: 924–942.
- ROGSTAD, S. H. 1992. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon* 41: 701–708.
- SAZIMA, I., S. VOGEL, AND M. SAZIMA. 1989. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Plant Systematics and Evolution* 168: 167–179.
- SILVA, J. M. C., M. C. SOUSA, AND C. H. CASTELLETTI. 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Global Ecology and Biogeography* 13: 85–92.
- SILVA, K. A. D., E. D. L. ARAÚJO, AND E. M. N. FERRAZ. 2009. Estudo florístico do componente herbáceo e relação com solos em áreas de caatinga do embasamento cristalino e bacia sedimentar, Petrolândia, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 23: 100–110.
- SILVESTRO, D., G. ZIZKA, AND K. SCHULTE. 2014. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution* 68: 163–175.
- SIQUEIRA-FILHO, J. A., AND E. M. C. LEME. 2006. *Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: Biodiversidade, conservação e suas Bromélias*. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobson Estúdio Editorial.
- VELLOSO, A. L., E. V. S. B. SAMPAIO, A. M. GIULIETTI, M. R. V. BARBOSA, A. A. J. F. CASTRO, L. P. DE QUEIROZ, A. FERNANDES ET AL. 2002. Ecorregiões propostas para o bioma da caatinga. Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental - The Nature Conservancy do Brasil, Recife, Brazil.
- VERSIEUX, L. M., T. WENDT, R. B. LOUZADA, AND M. G. L. WANDERLEY. 2008.

- Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 98–110.
- WAGNER, N. D., T. WÖHRMANN, V. ÖDER, M. M. A. BURMEISTER, AND K. WEISING. 2015. Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: a case study in *Fosterella* (Pitcairnioideae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 2231–2246.
- WERNECK, F. P., G. C. COSTA, G. R. COLL, D. E. PRADO, AND J. W. SITES JR. 2011. Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidence. *Global Ecology and Biogeography* 20: 272–288.
- WIENS, J. J., AND C. H. GRAHAM. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 519–539.
- WÖHRMANN, T., AND K. WEISING. 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. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 635–647.
- WÖHRMANN, T., D. S. DE BARROS-PINANGÉ, F. KRAPP, A. M. BENKO-ISEPPON, B. HUETTEL, AND K. WEISING. 2013. Development of 15 nuclear microsatellite markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources* 5: 81–84.

TABLES

TABLE 1. Plant material of *E. spectabile* analyzed in the present study. Abbreviations of populations used in the main text are listed in the first column.

Population	N	Location	Latitude	Longitude	Region
GAJ	10	Poço Redondo - SE	-9.663194	-37.664611	Sergipe
CSF	18	Canindé do São Francisco -SE	-9.710944	-37.977611	Sergipe
GLO	7	N. Sra. da Glória - SE	-10.15463	-37.37389	Sergipe
JAC	18	Jacobina – BA	-11.190833	-40.509556	Northern Espinhaço Range
LAJ	21	Morro do Chapéu - BA	-11.331417	-41.325861	Northern Espinhaço Range
TAB	9	Morro do Chapéu - BA	-11.601472	-41.164667	Northern Espinhaço Range
LBD	10	Morro do Chapéu - BA	-11.27125	-41.088056	Northern Espinhaço Range
FRD	9	Morro do Chapéu - BA	-11.627917	-41.000500	Northern Espinhaço Range
BMD	12	Brejo da Madre de Deus - PE	-8.183639	-36.381667	Borborema Plateau
CUP	10	Cupira - PE	-8.624861	-35.978222	Borborema Plateau
TEX	9	Teixeira - PB	-7.20250	-37.259139	Borborema Plateau
QUM	10	Queimadas - PB	-7.355361	-35.902139	Borborema Plateau
PCV	10	Agrestina - PE	-8.38333	-36.0000	Borborema Plateau
GUA	10	Agrestina - PE	-8.36670	-35.91667	Borborema Plateau
SNB	20	Bezerras - PE	-8.157222	-35.756194	Borborema Plateau
CAT	13	Buíque - PE	-8.5437	-37,2528	Borborema Plateau
IFG	10	Petrolina - PE	-9.405836	-40.505436	Southern Caatinga
SOB	10	Sobradinho - BA	-9.398528	-40.809389	Southern Caatinga
FPL	9	Jaguarari - BA	-10.1381	-40.7748	Southern Caatinga
BPT	9	Petrolina - PE	-9.325778	-40.460317	Southern Caatinga

Notes: N = number of individuals per population; SE = Sergipe; BA = Bahia; PE = Pernambuco; PB = Paraíba.

TABLE 2. Genetic characteristics of eight nuclear SSR loci in 20 populations of *E. spectabile* ($N = 196$).

Locus	N_{anSSR}	Rs	H_o	H_e	F_{IS}	Reference
Acom_12.12	7	1.364	0.061	0.090	0.317*	Wöhrmann and Weising (2011)
Acom_67.2	7	2.271	0.327	0.359	0.089*	Wöhrmann and Weising (2011)
Acom_119.1	10	2.833	0.207	0.412	0.498*	Wöhrmann and Weising (2011)
ngDy_25	6	3.329	0.513	0.703	0.271*	Wöhrmann et al. (2013)
Eh1G03	28	6.197	0.461	0.921	0.500*	Hmeljevski et al. (2013)
Eh2A07	34	6.206	0.563	0.919	0.389*	Hmeljevski et al. (2013)
Eh2E01	36	6.743	0.322	0.947	0.661*	Hmeljevski et al. (2013)
Eh2B09	37	6.748	0.698	0.948	0.264*	Hmeljevski et al. (2013)
Mean	20.6	4,461	0.394	0.662	0.374	

Notes: N_{anSSR} = number of alleles at nSSR loci; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; Rs = allelic richness; F_{IS} = inbreeding coefficient; * = significant deviations from HWE determined for each locus in the population using GENEPOP ($P < 0.005$).

TABLE 3. Characteristics of four chloroplast microsatellite markers and results of genotyping in *E. spectabile* ($N = 234$). GeneBank accession numbers for each locus are given in the last column.

Locus	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	Size	N_{cpSSR}	Dv	PIC	GenBank acc. no.
DSSR-L02	F: TTATTTTCGATCTTATTGGCC R: AGGGTATAATATAAAGACGG	(T) ₁₁	75	2	0.139	0.129	KU131207
DSSR-L05	F: AGAGTAAATTTGCAGTACGC R: TATGTTGATCGTTACAGGCC	(A) ₂₁	107	6	0.675	0.612	KU131208
DSSR-L07	F: AACTTCGAGTTAATTAAGG R: AGATACTAGTTACCCTTCCC	(A) ₁₃	80	3	0.652	0.576	KU131209
Crypt_cpSSR_07	F: GTGGATTTATTTTTTGTCCC R: AGACCCCGGGCTCGAGGACG	(TA) ₄ (T) ₁₃	170	5	0.569	0.479	KC111439*

Notes: Size = expected length of the PCR product in basepairs; N_{cpSSR} = number of alleles per locus at cpSSR loci; Dv = observed diversity for each locus; PIC = polymorphism information content; * = primer pair published by Krapp et al. (2013).

TABLE 4. Genetic diversity in populations of *E. spectabile* revealed by eight nSSR and four cpSSR markers.

Population	nSSRs ($N = 196$)						cpSSRs ($N = 234$)					
	N	N_{anSSR}	R_s	H_o	H_e	F_{IS}	N	N_{acpSSR}	N_b	Prv	Hrs	Dv
GAJ	8	25	2.507	0.508	0.61	0.180*	10	6	2	1	0.700	0.200
CSF	17	55	2.452	0.502	0.587	0.148	18	5	2	0	0.389	0.111
GLO	6	19	2.202	0.425	0.69	0.410*	7	4	1	0	0	0
JAC	13	42	3.303	0.402	0.615	0.358*	18	4	1	1	0	0
LAJ	16	38	3.318	0.484	0.757	0.371*	21	5	2	2	0.726	0.257
TAB	9	34	3.427	0.488	0.688	0.305*	9	4	1	0	0	0
LBD	9	32	2.969	0.397	0.586	0.337*	10	5	2	0	0.7	0.2
FRD	7	33	3.342	0.612	0.722	0.166	9	6	3	1	1.778	0.639
BMD	11	37	3.035	0.481	0.565	0.155	12	5	2	1	0.955	0.409
CUP	8	40	3.438	0.768	0.805	0.049	10	5	2	1	0.992	0.467
TEX	9	37	3.414	0.476	0.672	0.304*	9	6	3	2	1.778	0.667
QUM	8	31	3.114	0.515	0.697	0.277*	10	5	2	0	0.992	0.467
PCV	9	29	3.043	0.409	0.641	0.376*	10	5	2	0	0.933	0.356
GUA	8	34	3.310	0.673	0.689	0.024	10	5	2	1	0.992	0.467
SNB	20	43	3.043	0.458	0.610	0.254*	20	4	1	0	0	0
CAT	11	53	4.081	0.546	0.714	0.245*	13	6	3	2	1.077	0.295
IFG	4	21	2.625	0.429	0.577	0.287	10	5	2	0	0.933	0.356
SOB	9	44	3.768	0.480	0.668	0.294*	10	5	2	1	0.992	0.467
FPL	8	32	3.017	0.420	0.642	0.363*	9	4	1	0	0	0
BPT	6	27	3.050	0.471	0.598	0.229*	9	4	1	0	0	0
Average		35.3	3.123	0.497	0.657	0.257		4.9	1.9	0.7	0.697	0.268

Notes: N = total number of samples; N_{anSSR} = number of alleles across eight nuclear SSR loci; R_s = allelic richness; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; F_{IS} = inbreeding coefficient; N_{acpSSR} = number of alleles at chloroplast SSR loci; N_b = number of haplotypes; Hrs = haplotype richness; Prv = private haplotypes; * = significant deviations from HWE determined by a global multi-locus test implemented in GENEPOP ($P < 0.005$).

TABLE 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) and degrees of freedom (df) for eight nuclear and four chloroplast SSR markers in populations of *E. spectabile*. The groups revealed by a Bayesian STRUCTURE analysis ($K = 2$) were considered for both marker types.

Source of variation	nSSRs			cpSSRs		
	df	% of variation	F-statistics	df	% of variation	F-statistics
Among groups	1	20.22	$F_{CT} = 0.2021^*$	1	25.63	$F_{CT} = 0.2563^*$
Among populations within groups	18	13.17	$F_{SC} = 0.1650^*$	18	64.57	$F_{SC} = 0.8682^*$
Within Populations	372	66.62	$F_{ST} = 0.3338^*$	213	9.5	$F_{ST} = 0.9020^*$

Notes: F_{CT} = differentiation among groups; F_{SC} = differentiation among populations within groups; F_{ST} = differentiation among populations; * = significant values with $P \leq 0.0001$.

FIGURES

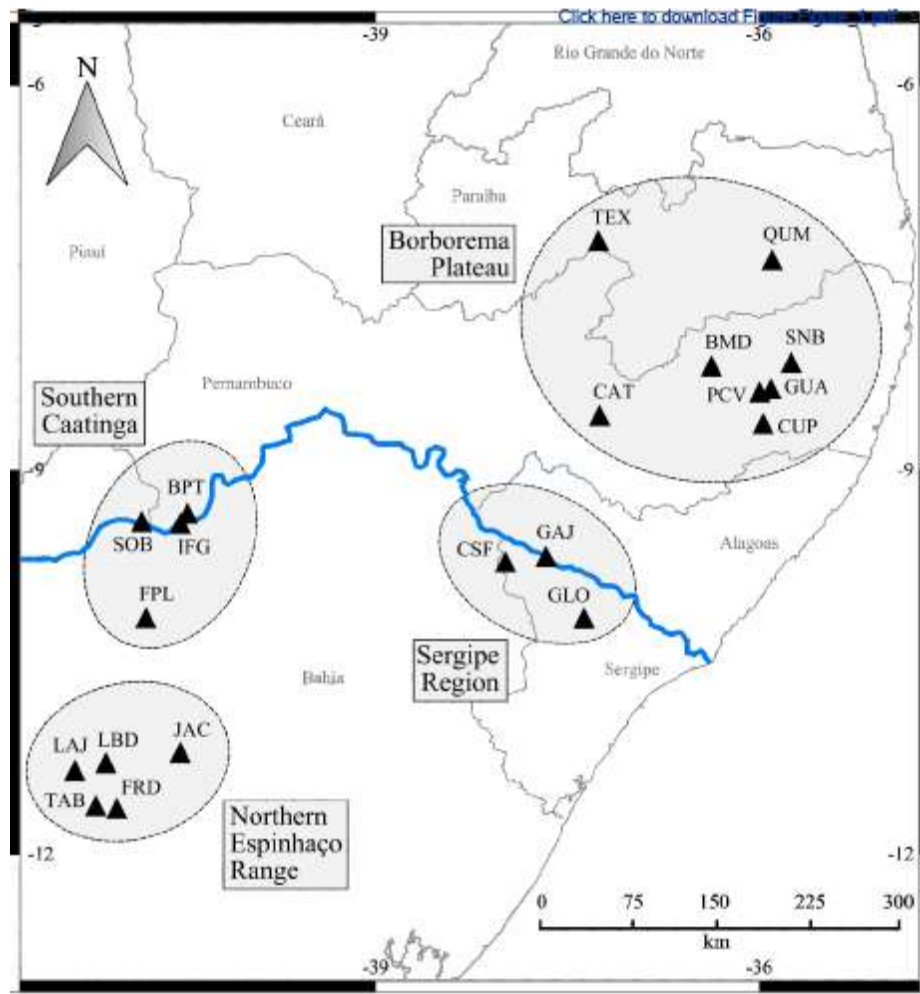


Fig. 1 – Geographic distribution of sampled populations of *E. spectabile* in northeastern Brazil. Four geographic regions are encircled by dotted lines. The São Francisco River course is highlighted in blue. Each triangle represents one sampling location labeled by its specific initial (see Table 1 for abbreviations).

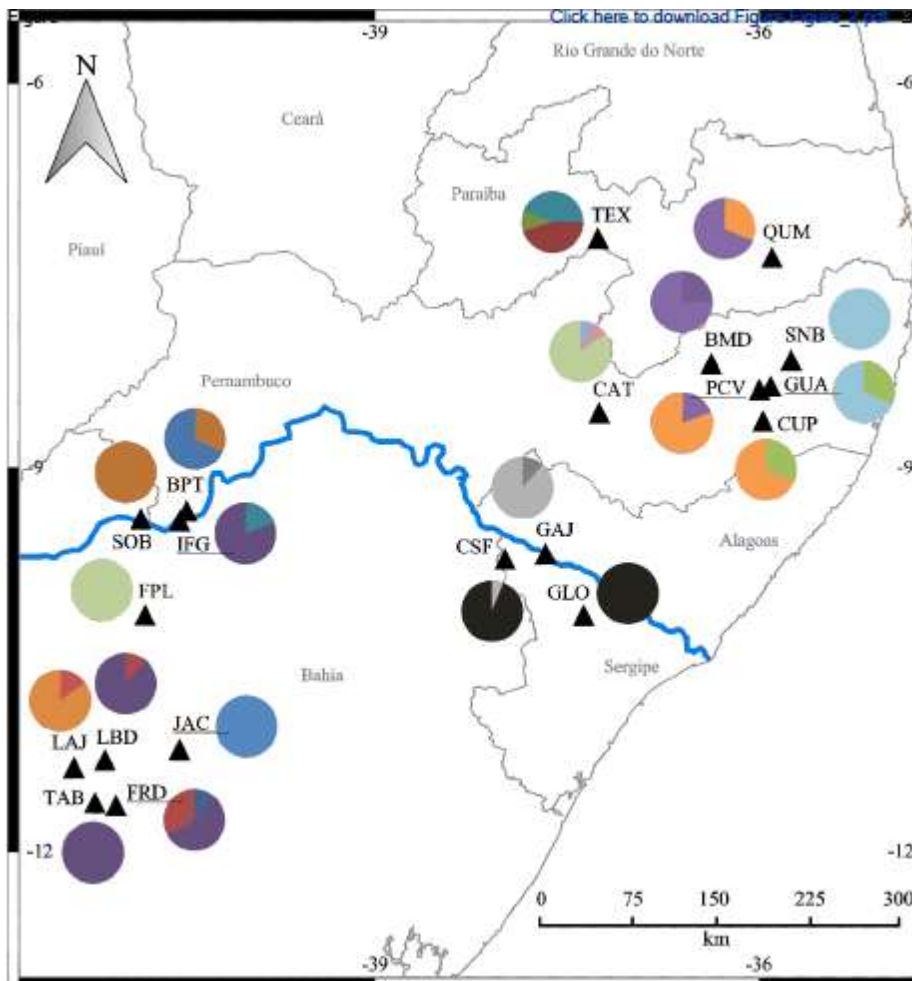


Fig. 2 – Chloroplast haplotypes present in *E. spectabile* populations (Appendix S1 see Supplemental Data with the online version of this article, Table 4) analyzed in the present study. Each population is represented by a triangle and pie charts illustrates its haplotype frequency. Each haplotype is represented by a different colour. .

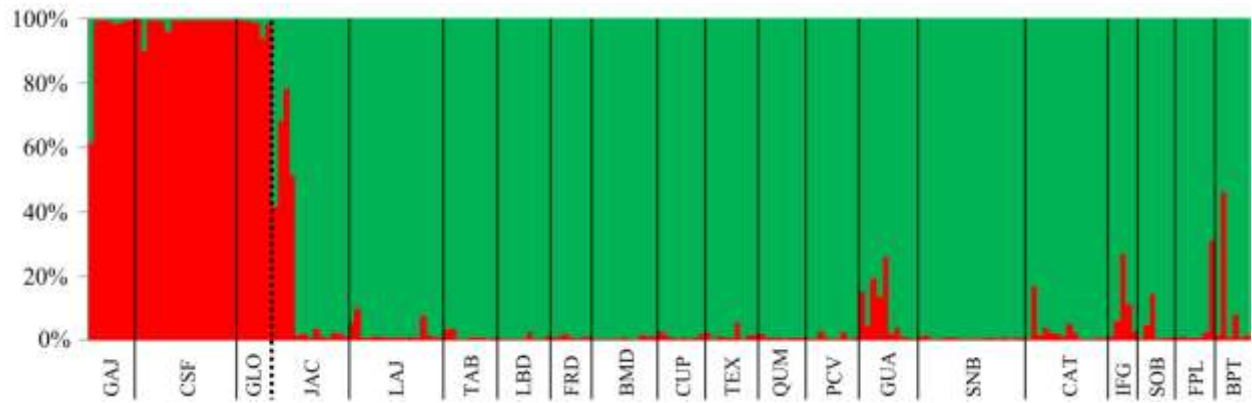


Fig. 3 – Bar plot of two clusters ($K = 2$) according to a STRUCTURE analysis based on eight nSSR markers: cluster 1 is shown in red and cluster 2 in green. Populations are delimited from each other by vertical black lines. The dotted line represents the split between the populations from Sergipe region and the remaining populations.

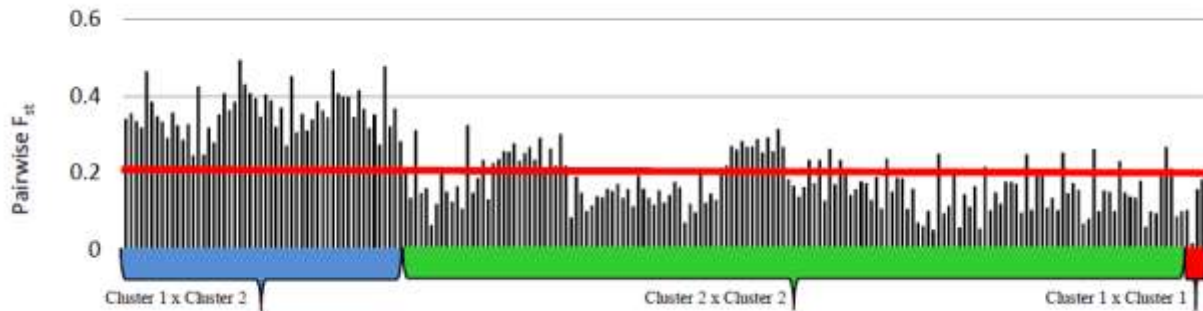
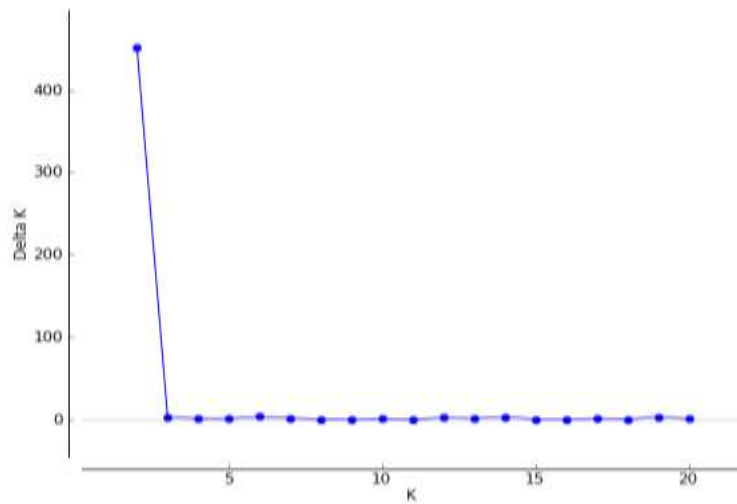


Fig. 4 – Comparison of nuclear pairwise F_{ST} values within and among clusters 1 and 2 suggested by the STRUCTURE analysis ($K = 2$). The red line indicates an F_{ST} value of 0.2.

APPENDIX S1. List of haplotypes detected at four cpSSR loci in 20 populations of *Encholirium spectabile*. Populations from Sergipe are characterized by unique haplotypes that are not present in any other region. Private haplotypes are highlighted in grey and their corresponding frequencies are shown in the last column.

	Sergipe			Northern Espinhaço Range					Borborema Plateau							Southern Caatinga						
Haplotype	G A J	C S F	G L O	J A C	L A J	T A B	L A B	F R D	X	B M D	C U P	T E X	Q U M	P C M	G U A	S N B	C A T	I F G	S O B	F P L	B P T	Frequencies of private haplotypes
H1								X														0.1111
H2												X										0.4444
H3												X										0.1111
H4						X	X	X										X				
H5												X						X				
H6																			X		X	
H7																		X				0.7000
H8							X	X														
H9															X							0.3000
H10									X													0.2500
H11	X																					0.1000
H12					X																	0.8571
H13				X																		1.0000
H14					X																	0.1429
H15										X												0.3000
H16									X				X	X								
H17		X	X																			
H18										X		X	X									
H19																				X		1.0000
H20																				X		0.0769
H21																				X	X	
H22	X	X																				
H23														X	X							

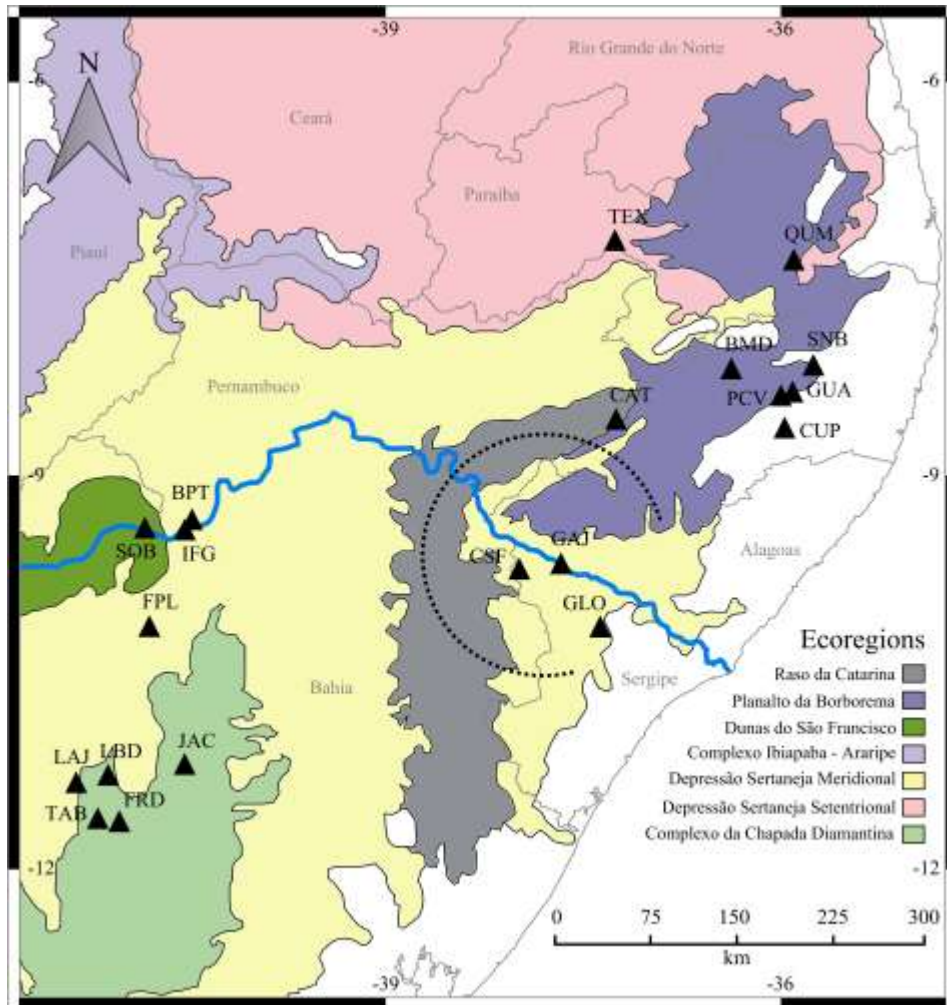
APPENDIX S2. Magnitude of ΔK from STRUCTURE analysis to determine the ideal number of clusters present in 20 populations of *Encholirium spectabile* based on eight nSSR loci and the Evanno method implemented in the STRUCTURE HARVESTER software (Earl and vonHoldt, 2012). The highest ΔK value was obtained for $K = 2$.



APPENDIX S3. Matrix of pairwise F_{ST} values based on allele data at eight nuclear (below diagonale) and four chloroplast SSR loci (above diagonale) among 20 populations of *Encholirium spectabile*. Almost all of the values estimated for both marker types were significant ($P \leq 0.001$); insignificant F_{ST} values (with $P > 0.001$) are written in bold. For abbreviations of populations see Table 1.

	GAJ	GLO	CSF	JAC	LAJ	TAB	LBD	FRD	BMD	CUP	TEX	QUM	PCV	GUA	SNB	CAT	IFG	SOB	FPL	BPT
GAJ	-	0.770	0.767	0.963	0.891	0.927	0.893	0.805	0.815	0.783	0.818	0.783	0.811	0.705	0.887	0.744	0.869	0.855	0.824	0.925
GLO	0.179	-	0.000	1.000	0.903	1.000	0.959	0.865	0.796	0.730	0.875	0.730	0.792	0.862	1.000	0.910	0.930	0.908	1.000	1.000
CSF	0.047	0.184	-	0.981	0.907	0.974	0.951	0.892	0.821	0.768	0.901	0.768	0.809	0.878	0.973	0.910	0.934	0.921	0.961	0.974
JAC	0.334	0.326	0.353	-	0.879	1.000	0.977	0.939	0.941	0.928	0.913	0.939	0.943	0.945	1.000	0.969	0.955	0.950	1.000	1.000
LAJ	0.354	0.372	0.381	0.200	-	0.910	0.887	0.846	0.820	0.764	0.758	0.811	0.778	0.847	0.939	0.909	0.841	0.864	0.940	0.938
TAB	0.329	0.311	0.370	0.147	0.146	-	0.000	0.281	0.867	0.918	0.667	0.893	0.933	0.909	1.000	0.913	0.097	0.856	1.000	1.000
LBD	0.453	0.433	0.481	0.254	0.188	0.156	-	0.109	0.816	0.885	0.615	0.848	0.897	0.872	0.978	0.868	0.074	0.804	0.944	0.889
FRD	0.397	0.373	0.416	0.137	0.202	0.102	0.185	-	0.683	0.794	0.548	0.721	0.801	0.768	0.926	0.744	0.233	0.677	0.808	0.665
BMD	0.377	0.388	0.412	0.210	0.199	0.158	0.260	0.194	-	0.651	0.811	0.206	0.634	0.806	0.932	0.744	0.803	0.839	0.814	0.877
CUP	0.336	0.349	0.377	0.109	0.18	0.106	0.277	0.151	0.149	-	0.788	0.409	0.066	0.641	0.878	0.828	0.856	0.814	0.877	0.913
TEX	0.301	0.321	0.342	0.148	0.208	0.141	0.273	0.136	0.169	0.100	-	0.804	0.810	0.751	0.919	0.851	0.445	0.667	0.889	0.824
QUM	0.365	0.380	0.400	0.203	0.189	0.156	0.265	0.156	0.178	0.141	0.062	-	0.337	0.725	0.908	0.745	0.827	0.819	0.812	0.887
PCV	0.348	0.348	0.387	0.173	0.211	0.158	0.281	0.222	0.18	0.072	0.132	0.173	-	0.657	0.900	0.835	0.867	0.827	0.896	0.929
GUA	0.259	0.275	0.324	0.120	0.146	0.119	0.248	0.177	0.195	0.111	0.148	0.179	0.171	-	0.344	0.745	0.836	0.767	0.812	0.904
SNB	0.321	0.329	0.358	0.164	0.160	0.123	0.265	0.197	0.204	0.098	0.162	0.160	0.137	0.102	-	0.899	0.958	0.933	1.000	1.000
CAT	0.248	0.274	0.288	0.104	0.138	0.106	0.229	0.113	0.142	0.066	0.074	0.098	0.125	0.078	0.079	-	0.854	0.859	0.006	0.905
IFG	0.404	0.419	0.438	0.271	0.175	0.203	0.282	0.249	0.263	0.218	0.213	0.210	0.243	0.218	0.185	0.137	-	0.746	0.915	0.836
SOB	0.225	0.293	0.298	0.126	0.141	0.120	0.217	0.157	0.180	0.111	0.118	0.114	0.155	0.099	0.139	0.058	0.166	-	0.909	0.637
FPL	0.322	0.350	0.359	0.200	0.205	0.151	0.293	0.217	0.213	0.128	0.157	0.199	0.190	0.160	0.124	0.097	0.221	0.086	-	1.000
BPT	0.292	0.317	0.331	0.203	0.193	0.154	0.267	0.221	0.239	0.195	0.149	0.194	0.186	0.159	0.155	0.112	0.173	0.106	0.110	-

APPENDIX S4. Ecoregions and geographic distribution of sampled populations of *E. spectabile* in northeastern Brazil (map was modified according to Velloso et al., 2002). Each ecoregion is indicated by a colour code; each triangle represents one sampling location labeled by its specific initial (see Table 1 for abbreviations). The blue line represents the São Francisco River. The dotted line symbolizes the genetic isolation of the three populations from the Sergipe region (CSF, GAJ and GLO).



CAPÍTULO 3 – Population genetic structure in *Encholirium magalhaesii* (Bromeliaceae), an endemic species from Espinhaço Range

Rodrigo C. Gonçalves-Oliveira, Tina Wöhrmann, Ana M. Benko-Iseppon, Florian Krapp, Maria das Graças L. Wanderley and Kurt Weising

Manuscrito de artigo científico submetido ao periódico **Biochemical Systematic and Ecology**.

Population genetic structure in *Encholirium magalhaesii* (Bromeliaceae), an endemic species from Espinhaço Range

Rodrigo C. Gonçalves-Oliveira^{a,b,c,*}, Tina Wöhrmann^c, Ana M. Benko-Iseppon^{a,b}, Florian Krapp^c, Maria das Graças L. Wanderley^d and Kurt Weising^c

^aUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CDU, 50.670 – 420, Recife, Brazil.

^bUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CDU, 50.670 – 420, Recife, Brazil.

^cSystematics and Morphology of Plants, Institute of Biology, University of Kassel, Heinrich-Plett-Str. 40, 34132 Kassel, Germany.

^dInstituto de Botânica de São Paulo, Av. Miguel Stéfano, 3687, Água Funda 04301-902 - São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 81 2126 7816

E-mail address: rod.biogen@gmail.com

Abstract

The genus *Encholirium* is an endemic species of the Brazilian Espinhaço Range, this comprises continuous altitude rocky fields (up to 1000 m) in eastern Brazil. *Encholirium* belongs to a xeric environment clade among Pitcairnioideae subfamily of Bromeliaceae and holds morphological and physiological adaptations to drought. Different to all other Bromeliaceae, previous genetic structure studies of *Encholirium* suggest that species presents a lower differentiation rate among populations when compared to other rocky outcrop representatives. In an attempt to clarify the genetic structure of *Encholirium* in Campos Rupestres and the role of pollen/seed flow in the genetic structure we applied nuclear and chloroplast microsatellite markers to individuals of *E. magalhaesii* collected in four localities on the Diamantina municipality in Southeastern Brazil. Our results support a lack of nuclear genetic structuration among localities ($F_{ST} = 0.1987$) and higher chloroplast genetic structure ($F_{ST} = 0.4963$), also confirmed by differential migration rates estimations. Pollen/Seed flow suggests that pollination is more efficient in spreading the genetic diversity between sites than seed flow. The results bring enough evidence that the rocky fields provide a suitable continuum for the pollination and maintenance of the genetic structure of this *Encholirium* species.

Key-words: Microsatellite, SSR, Gene flow, Pitcairnioideae.

1. Introduction

The Espinhaço Range is a rocky mountain chain in central-eastern Brazil between the states of Minas Gerais and Bahia that is mainly covered by an ecosystem known as Campos Rupestres (Gontijo, 2008). This ecosystem is formed by a heterogeneous environment where several endemisms and specialization of plants occur (Rapini et al., 2008). Among the endemisms found in this region, the high amount of Bromeliaceae species is remarkable (Versieux et al., 2008). One of these bromeliads is *Encholirium magalhaesii* L.B.Sm., a species that forms small populations over rocks or rocky soils (Forzza, 2005). With estimated 31 species, *Encholirium* belongs to the Pitcairnioideae subfamily that includes many species adapted to xeric environments (Forzza, 2005; Givnish et al., 2011; Forzza and Leme, 2015).

It is known that environmental traits such as fragmentation and isolation of populations, as so as reproductive characteristics (sexual or clonally reproduction) and environmental factors (as pollination and seed dispersal) are expected to influence gene flow, genetic diversity and structure of natural populations (Dick et al. 2008; Jaquemyn et al. 2012). Previous studies on Campos Rupestres based on RAPD markers have shown that clonally reproduction in endemic *Encholirium* species is low, and sexual reproduction may play a significant role in the genetic structure and gene flow among populations (Cavallari et al., 2006). This study also showed that population genetic structure of *Encholirium* in Campos Rupestres comprised much less differentiation between populations (*Encholirium* $\phi_{ST} \sim 0.1$; Cavallari et al. 2006) than other rocky outcrop bromeliads. In this way, it has been considered that Campos Rupestres bromeliads lack population genetic structuration, which is mainly related to the behavior of pollinators or the effectiveness of seed dispersal (Lavor et al. 2014).

Besides the previous works, the contribution of pollen and seed flow to the genetic structure and gene flow of bromeliads that occur in Campos Rupestres is still unclear. A picture of how pollen and seed flow affect the genetic structure of populations can be assessed by the nuclear vs. chloroplast genetic differentiation, once they present a maternal-paternal and maternal heritage, respectively (Ennos, 1994, Wagner *et al.*, 2015). Microsatellite markers have been widely used to evaluate the gene flow and genetic structure of natural Bromeliaceae populations of different taxa (Barbará et al., 2007, 2009, Palma-Silva et al., 2009, Lavor et al., 2014, Goetze et al., 2015).

These studies are supported by molecular markers developed for Bromeliaceae, including many nuclear (e.g. Sarthou et al., 2003; Boneh et al., 2003; Palma-Silva et al., 2007; Paggi et al., 2008; Wöhrmann and Weising, 2011; Wöhrmann et al., 2012, 2013) and chloroplast (e.g. Krapp et al., 2012, 2013) markers.

To test if pollination or seed dispersal is more efficient in promoting the gene flow and admixture of *E. magalhaesii* populations from the Diamantina Plateau, we (i) assessed the genetic diversity and genetic structure among populations in rocky fields by applying a set of nuclear and chloroplast microsatellite markers samples collected in four localities. A nuclear/chloroplast approach also allowed us to (ii) clarify the pattern of gene flow and genetic differentiation between localities, by inferring about the role of pollen/seed flow on the genetic structure and comparing the gene flow between chloroplast and nuclear markers and finally. Further, the present work intends to (iii) give advice aiming to the species conservation.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Throughout the field work in September/2011 in the municipality of Diamantina, Minas Gerais state, Brazil, 40 individuals of *Encholirium magalhaesii* were collected in four localities (Fig. 1, Table 1). For each sample, fresh leaves were stored in 98% CTAB to avoid oxidation (Rogstad et al., 1992). *E. magalhaesii* occurs in groups of a small number of plants growing on rock outcrops in Diamantina Plateau. Sampling was planned to maximize the collection in each area, and each visually connected mat was collected just once.

2.2 Molecular markers and genotyping

DNA extraction was conducted according to Weising et al. (2005). A total of four nuclear microsatellite markers (nSSR) previously developed for *Ananas comosus* (L.) Merr. (Wöhrmann and Weising, 2011), *Encholirium horridum* L.B.Sm (Hmeljevksi et al., 2013) and *Dyckia marnier-lapostollei* L.B.Sm. var. *estevesii* Rauh (Wöhrmann et al., 2013) were applied to the collected samples of *E. magalhaesii* [Acom 119.1, Acom 12.12, Eh2B09 and ng_Dy25] .

PCR conditions were conducted as previously described for each primer. Electrophoresis of the PCR products was carried out in denaturing 6% polyacrylamide (PAA) gel and visualization occurred according to the procedure outlined by Wagner et al. (2015).

Chloroplast markers for *E. magalhaesii* were generated using four microsatellite markers (cpSSRs: DSSR_N01, DSSR_N4, DSSR_N7, and DSSR_N14) developed for *Dyckia marnier-lapostollei* var. *estevesii* by Krapp et al. (2012) and Krapp (2013). PCR amplification and electrophoresis followed the protocol described by Krapp et al. (2012).

2.3 Statistical analysis

The raw data matrix for both nSSR and cpSSR were double checked to avoid genotyping errors. Standard molecular parameters were measured for the nSSR data obtained for the 39 individuals sampled [including inbreeding coefficient (F_{IS}), observed heterozygosity (H_o) and observed heterozygosity (H_e) under Hardy-Weinberg equilibrium] using MSA program (Dieringer and Schlötterer, 2003). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were also analyzed with the aid of GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995). Assuming that all localities belong to the same group an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed with ARLEQUIN (version 3.5; Excoffier et al., 2005) considering 10.000 iterations for the permutation test, and calculation of overall F_{ST} values. Additionally pairwise F_{ST} values between each locality were assessed. To identify clones, we searched for identical nSSR genotyping between individuals from the same population using ARLEQUIN.

Differential migration rates ($N_e m$) between localities were measured by the maximum likelihood method implemented on MIGRATE-n (version 1.2; Beerli and Felsenstein, 1999). To estimate migration rates between each location we used a Brownian motion mutation model with constant mutation rates and starting parameters based on F_{ST} calculations. The run was conducted with 5000000 interactions including a 500000 burn-in period and sampling the parameter value every 100 interactions.

The cpSSR data generated (at four polymorphic loci across the whole sampling) was analyzed with the program HAPLOTYPE (version 1.05; Eliades and Eliades, 2009) where genetic diversity (D_v), haplotype richness (H_{rs}) the number of private haplotypes (Pr_v) and polymorphisms were measured. An AMOVA was also conducted, where the data was analyzed

in ARLEQUIN. Differential migration rates ($N_e m$) between localities were also measured on MIGRATE with the same parameters applied for the nuclear microsatellites. Since no recombinations occurs in chloroplast genome by its only maternally heritage we considered each haplotype as one information for the migration analysis.

The correlation between pollen/seed flow (PSF) was calculated based on a comparison of F_{ST} values measured for nuclear and chloroplast markers, as proposed by Ennos (1994). Individuals with the same alleles in chloroplast and nuclear markers were considered as clones, the identification of these individuals was made using ARLEQUIN.

3. Results

3.1 Population genetic diversity

Genetic parameters per locus and per population are summarized in Table 2. nSSR primers provided 30 different alleles for 39 individuals from four localities. The number of alleles per population varied between 10 and 21. Observed and expected heterozygosity per population ranged from 0.2884 to 0.7393 and 0.3448 to 0.6975, respectively. Allele richness varied between 4.2685 and 9.1039. Inbreeding coefficient (F_{IS}) were not significant under heterozygote excess or deficit tests, suggesting that the populations are under Hardy-Weinberg Equilibrium (Table 2).

Nine haplotypes were identified by the cpSSR. These varied per locality from four to eight haplotypes (Table 2). Chloroplast genetic diversity (D_v) ranged from 0.1429 to 0.8667. Three populations presented up to three haplotypes. Haplotype richness (H_{rs}) varied from 0.4286 to 3 per population. Each population presented at a maximum of 2 private haplotypes.

3.2 Genetic structure

The AMOVA results show that the major part of the nSSR genetic diversity is shared between individuals within localities in comparison to existing diversity among localities (Table 3). Besides this pattern, we found significant structuration between localities ($F_{st}=0.1987$; $P \leq 0.0001$), but low F_{ST} values suggest gene flow and admixture between localities. Nuclear pairwise F_{st} values (Table 4) were significant ($P \leq 0.0001$) between all pairs of populations

except between CVM/CJK and CVM/ERA. Migration rates between most of the localities are positive ($N_e m > 1$) with ERA population presenting nuclear positive gene flow for all populations, except in regard to receiving from CVM (Fig. 2).

CpSSR AMOVA results show that the genetic diversity shared within localities is almost even, the localities shared 49.63% differentiation, whereas 50.37% is shared within localities (Table 3). Differentiation on chloroplast level was higher among localities (F_{ST} 0.4963).

Haplotype migration rates showed less than one individual per generation ($N_e m < 1$) for all comparisons (Fig. 2). The population EMV showed no gene flow from or to the other populations. Chloroplast pairwise F_{ST} values were all significant ($P \leq 0.0001$) and suggested a high differentiation between locations.

Six clones were detected (individuals with the same nSSR pattern) considering all analyzed localities. Three occurred in population ERA and three on EMV. The PSF ratio calculated for the data was 1.99.

4. Discussion

4.1 Genetic diversity

A high amount of nuclear genetic diversity was detected for *E. magalhaesii* what is also found for other species of Bromeliaceae related to rocky environments (Boiselieur-Dubayle et al. 2010; Palma-Silva et al. 2011; Lavor et al. 2014). For other *Encholirium* species from Campos Rupestres, high amounts of genetic diversity were detected by RAPDs (*E. biflorum*, *E. pedicellatum*, and *E. subsecundum*) (Cavallari et al., 2006). The same situation applies to the Atlantic Forest inselberg species *E. horridum* and the Caatinga inselberg taxon *E. spectabile*, both with reported high levels of population genetic diversity (Hmeljevski et al., 2015; Gonçalves-Oliveira et al., *in prelo*), indicating that this is a pattern of the group. However, in contrast with other bromeliads, *E. magalhaesii* presents no heterozygote deficit over locations. Instead, Hardy-Weinberg equilibrium is expected. This agrees with the F_{IS} values observed, that were not statistically significant ($P > 0.005$) and suggested no inbreeding and efficient gene flow between localities. Inbreeding coefficient can be masquerade by geitonogamy or by the sampling of clones. Indeed, despite the caution of collecting a single individual from each mat, some

clones were detected in our sampling. Anyway, their low frequency may not affect directly the inbreeding coefficients of *E. magalhaesii*, confirming what was also found for other *Encholirium* species. Cloning may occur at low rates and is probably just related to the replacement of the individual, in a similar movement as found in *Aechmea nudicaulis* (Loh et al. 2015). As usual, it is expected that chloroplast genetic diversity is lower than nuclear, even though more than one haplotype was found per population in the present study.

4.2 Genetic structure

The expectations of low genetic differentiations between *E. magalhaesii* localities were fulfilled, F-statistic and AMOVA results suggest effective mating due to no significant genetic structuration between localities. Also, most of the genetic diversity was shared within localities, so each locality holds an amount of diversity that is similar to other localities. This result agrees with the findings for *E. subsecundum* and *Vriesea minarum* in the Espinhaço Range, where the F_{ST} values indicated a lack of population structuring and a higher amount shared genetic markers within populations (Cavallari et al. 2006; Lator et al., 2014). In turn, the findings for *E. magalhaesii* are not in accordance with all other studies made with rocky inselberg related bromeliads of the genus *Alcantarea* and *Pitcairnia* (Barbará et al., 2007, 2009; Boiselier-Dubayle et al. 2010; Palma-Silva et al., 2011).

As the comparisons between chloroplast and nuclear pairwise F_{ST} shows that nuclear genetic differentiation (pollen/seed driven) is higher than chloroplast differentiation (seed driven). Thus, the PSF ratio suggests that for *E. magalhaesii* pollination plays the most effective role in maintaining the admixture of genetic diversity. Despite the ecological differences between the studies, other bromeliad species with wind seed dispersal like *Vriesea gigantea* also showed significantly more effective pollen than seed flow (Palma-Silva et al., 2009). This scenario suggests that in Campos Rupestres, pollination and seed dispersal may be more efficient than in inselbergs. Considering seed dispersal, it has been shown that a heterogeneous matrix that isolates populations normally reduces the gene flow link between populations (Boiselier-Dubayle et al., 2010) (for a comprehensive review regarding inselbergs see Porembski & Barthlot, 2000).

4.2 Gene flow between localities

The amount of gene flow is mandatory for speciation, once their absence leads to a subsequent isolation between two populations and can drive speciation over evolutionary time (Ellstrand, 2014). At the same time, gene flow within species tends to maintain species cohesion and seems to prevent inbreeding and introgression with close related species (Petit and Excoffier, 2009). As discussed above, the here generated data on genetic diversity and structure of *E. magalhaesii* suggest effective gene flow between localities, mostly by pollen. The results obtained by MIGRATE also showed that the nuclear gene flow between populations is mostly positive, except by the population EMV that probably does not donate pollen to the remaining populations.

The differential gene flow between populations that donate migrants and other that tend just to receive, may be affected by fragmentation caused by human interference or even by the behavior of pollinators (bats) that could avoid some disturbed areas (Sazima et al. 1989; Jacquemyn et al. 2012; Wanderley et al., *in press*). Besides that, as suggested in the case of other wind-dispersed species, seeds tend to have less dispersal power than pollen. In *Encholirium* seeds may fall near the mother plant, rarely founding new populations (Cavallari et al. 2006). Pairwise F_{st} were significant but low in general terms, what supports a gene flow between localities.

4.4 Implications for conservation

Espinhaço range is known as an important endemism center for many plants and animals. As our results suggest, the four locations of *E. magalhaesii* present significant levels of genetic diversity. Considering the studied populations, the genetic structure and gene flow seems to be dependent on a suitable environment where pollinators can act efficiently. Isolation of these populations will possibly stop the pollen flow influencing the genetic equilibrium of these localities. *Ex-situ* conservation provided by protected environment may be the most efficient effort to avoid the genetic erosion caused by inbreeding in isolated populations (Keller and Waller, 2002; Jacquemyn et al. 2015).

5. Conclusions

In conclusion, the results presented in this study agree with previous works that indicate that bromeliads from Campos Rupestres in the Espinhaço range present a lack of nuclear genetic structure between localities. In turn, the findings show by the first time that chloroplast genetic structure was considerable between localities of this environment. The results also point out that pollination in *E. magalhaesii* seems to be more efficient in improving genetic diversity and admixture among populations than seed dispersal. Gene flow estimation by nuclear and chloroplast markers supports the same results obtained by the genetic structure analysis. However, it shows that the gene flow between localities may differ. Finally, it is advisable that protection of the environment may be the only possibility to prevent genetic erosion of populations.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support through the PROBRAL program (a joint initiative of CAPES, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel and DAAD, German Academic Exchange Service), as well for granting a sandwich research fellowship for the first author (CAPES Process 12429-12-0). The authors also thanks the Financial support obtained from CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development, Brasília, Brazil) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco).

References

- Barbará, T., Martinelli, G., Fay, M.F., Mayo, S.J., 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. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03272.x
- Barbará, T., Martinelli, G., Palma-Silva, C., Fay, M.F., 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. doi:10.1093/aob/mcn226
- 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. doi:10.1073/pnas.081068098
- Boisselier-Dubayle, M.C., Leblois, R., Samadi, S., Lambourdiere, 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 (Cop.)*. 33, 175–184. doi:10.1111/j.1600-0587.2009.05446.x
- Boneh, L., Kuperus, P., Van, T.P.H., 2003. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. *Mol. Ecol. Notes* 3, 302–303. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00432.x
- Cavallari, M.M., Forzza, R.C., Veasey, E.A., Zucchi, M.I., Oliveira, G.C.X., 2006. Genetic Variation in Three Endangered Species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, Selected using RAPD Markers. *Biodivers. Conserv.* 15, 4357–4373. doi:10.1007/s10531-005-3741-5
- Dick, C.W., Hardy, O.J., Jones, F.A., Petit, R.J., 2008. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Trop. Plant Biol.* 1, 20–33. doi:10.1007/s12042-007-9006-6
- Dieringer, D., Schlötterer, C., 2003. (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol. Ecol. Notes* 3, 167–169. doi:10.1046/j.1471-8286
- Eliades N-G., Eliades D. G. 2009. HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany. URL <http://www.uni-goettingen.de/en/134935.html>.
- Ellstrand, N.C., 2014. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *Am. J. Bot.* 101, 737–753. doi:10.3732/ajb.1400024
- Ennos, R. a, 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity (Edinb.)*. 72, 250–259. doi:10.1038/hdy.1994.35

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1, 47–50. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Forzza, R.C., 2005. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart . ex Schult . & Schult . F. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 23, 1–49.
- Forzza, R.C., Leme, E.M.C., 2015. Three new species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from eastern Brazil 227, 13–24.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B. V., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J., 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am. J. Bot.* 98, 872–895. doi:10.3732/ajb.1000059
- Goetze, M., Büttow, M.V., Zanella, C.M., Paggi, G.M., Bruxel, M., Pinheiro, F.G., Sampaio, J.A.T., Palma-Silva, C., Cidade, F.W., 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. doi:10.1016/j.bse.2014.12.010
- Gontijo, B.M., 2008. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4, 7–15.
- Hmeljevski, K., Reis, M., Forzza, R., 2015. Patterns of Gene Flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a Monocarpic Species of Bromeliaceae From Brazil. *J. Hered.* 106, 93–101. doi:10.5061/dryad.fn675
- Hmeljevski, K.V., Ciampi, M.B., Baldauf, C., Sedrez Dos Reis, M., Forzza, R.C., 2013. Development of SSR markers for *Encholirium horridum* (Bromeliaceae) and transferability to other Pitcairnioideae. *Appl. Plant Sci.* 1. doi:10.3732/apps.1200445
- Jacquemyn, H., de Meester, L., Jongejans, E., Honnay, O., 2012. Evolutionary changes in plant reproductive traits following habitat fragmentation and their consequences for population fitness. *J. Ecol.* 100, 76–87. doi:10.1111/j.1365-2745.2011.01919.x
- Keller, L.F., Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230–241. doi:10.1016/S0169-5347(02)02489-8
- Krapp, F. 2013. Phylogenie und Evolution der Gattung *Dyckia* (Bromeliaceae). Ph.D. dissertation, University of Kassel, Kassel, Germany.

- Krapp, F., Cruz, G.A.S., Wohrmann, T., Benko-Iseppon, A.M., Weising, K., 2013. A set of variable plastid SSR markers for the genus *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Res. Plant Biol.* 3, 18–21.
- Krapp, F., Wöhrmann, T., Pinangé, D.S.D.B., Benko-Iseppon, A.M., Huettel, B., Weising, K., 2012. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. *Am. J. Bot.* 99, 2010–2013. doi:10.3732/ajb.1200153
- Lavor, P., van den Berg, C., Jacobi, C.M., Carmo, F.F., Versieux, L.M., 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *Am. J. Bot.* 101, 1167–1175. doi:10.3732/ajb.1300388
- Loh, R., Scarano, F.R., Alves-Ferreira, M., Salgueiro, F., 2015. Clonality strong affects the spatial genetic structure of the nurse species *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 178, 329–341. doi:10.1111/boj.12277
- Paggi, G.M., Palma-Silva, C., Bered, F., Cidade, F.W., Sousa, a. C.B., Souza, a. P., 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, 980–982. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02126.x
- Palma-Silva, C., Cavallari, M.M., Barbará, T., Lexer, C., Gimenes, M.A., Bered, F., Bodanese-Zanettini, M.H., 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. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01665.x
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, G.M., Barbará, T., Bered, F., Bodanese-Zanettini, M.H., 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity (Edinb.)* 103, 503–512. doi:10.1038/hdy.2009.116
- Palma-Silva, C., Wendt, T., Pinheiro, F. Fay, M.F., Wendt, T., Pinheiro, F., Barbara, T., 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs *Molec. Ecol.* 20, 3185–3201. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05143.x

- Petit, R.J., Excoffier, L., 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends Ecol. Evol.* 24, 386–393. doi:10.1016/j.tree.2009.02.011
- Porembski, S., Barthlot, W. *Inselbergs Biotic Diversity of Isolated Rock Outcrops in Tropical and Temperate Regions*, Ecological Studies 146, Springer, Heidelberg, Germany.
- Rapini, A., Ribeiro, P., Lambert, S., Pirani, J., 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4, 16–24.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journ. of heredity*, 86, 248-249.
- Rogstad, S. H. 1992. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon*, 41, 701-708.
- Sarthou, C., Boisselier-Dubayle, M.C., Lambourdie're, J., Samadi, S., 2003. Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L . B . Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Mol. Ecol. Notes* 3, 221–223. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00404.x
- Sazima, I., Vogel, S., Sazima, M., 1989. Bat Pollination of *Encholirium glaziovii*, a Terrestrial Bromeliad. *Plant Syst. Evol.* 168, 167–179. doi: 10.1007/Bf00936097
- Versieux, L.M., Wendt, T., Louzada, R.B., Wanderley, M.G.L., 2008. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4, 99–110.
- Wagner, N.D., Wöhrmann, T., Öder, V., Burmeister, A., Weising, K., 2015. Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: a case study in *Fosterella* (Pitcairnioideae). *Plant Syst. Evol.* doi:10.1007/s00606-015-1226-x
- Wagner, N.D., Wöhrmann, T., Öder, V., Burmeister, A., Weising, K., 2015. Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: a case study in *Fosterella* (Pitcairnioideae). *Plant Syst. Evol.* doi:10.1007/s00606-015-1226-x
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC press, Boca Raton, USA.
- Wöhrmann, T., de Barros Pinangé, D.S., Krapp, F., Benko-Iseppon, A.M., Huettel, B., Weising, K., 2013. Development of 15 nuclear microsatellite markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conserv. Genet. Resour.* 5, 81–84. doi:10.1007/s12686-012-9738-y

Wöhrmann, T., Wagner, N., Krapp, F., Huettel, B., Weising, K., 2012. Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Am. J. Bot.* 99, 160–163. doi:10.3732/ajb.1100470

Wöhrmann, 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. doi:10.1007/s00122-011-1613-9

Figures

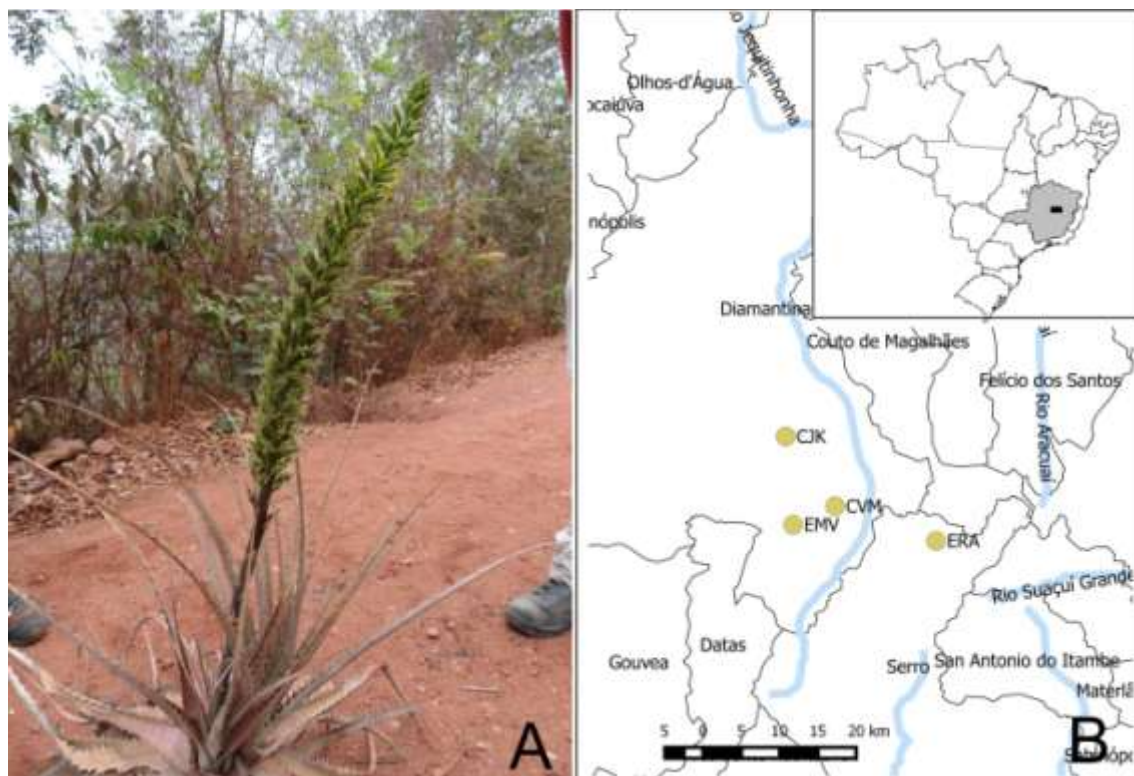


Fig. 1

A – General aspect from a flowering individual of *E. magalhaesii* collected in Diamantina, Minas Gerais state. B – Map of collected plots, where each location is indicated by a circle. The state of Minas Gerais is signed on the upper left part of the map of Brazil, and the black rectangle regards the position of the collected plots.

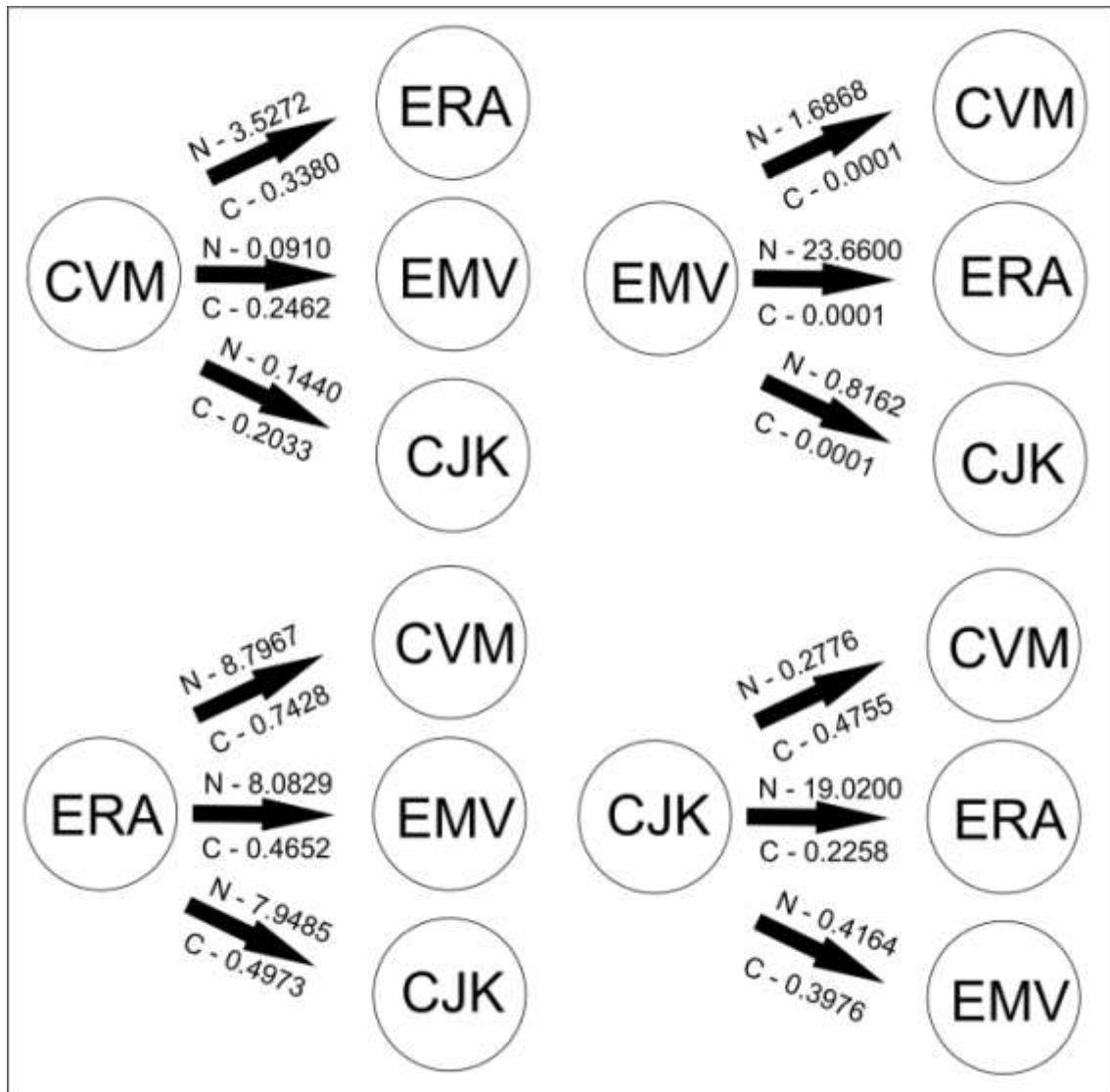


Fig. 2

Migration chart representing the N_m between pairs of localities from *E. magalhaesii* on cadeia do espinhaço in Diamantina. Each circle is signed by the initials of each locality according to the Table 1. Arrows show the direction of gene flow. Nuclear gene flow is signed by an N and is placed over the respective arrow. Chloroplast gene flow is signed by a C and is placed under the respective arrow. N_m is considered to be effective only when higher than 1 individual per generation.

Tables

Table 1

Collected populations from *E. magalhaesii*. N - Number of samples per populations, Lat. - Latitude and Long. - Longitude. All mats have been collected at the indicated locations.

Population	N	Lat.	Long.
CVM - Fazenda Cavalo Morto	14	-18.2883	-43.506
ERA - Estrada Real	6	-18.3111	-43.558
EMV - Estrada Milho Verde	13	-18.3311	-43.3809
CJK - Campus JK	6	-18.2021	-43.5671

Table 2

Genetic diversity in populations of *E. magalhaesii* revealed by four nSSR and four cpSSR markers.

Population	N	N _{anSSR}	H _o	H _e	R _s	F _{IS}	N _b	D _v	H _{rs}	Prv
CVM - Fazenda Cavalo Morto	14	21	0.7393	0.6762	9.1039	-0.1357	4	0.1429	0.4286	0
ERA - Estrada Real	6	10	0.3292	0.3448	4.1685	-0.0603	6	0.6000	2.0000	2
EMV - Estrada Milho Verde	13	16	0.2885	0.4585	7.6867	0.3196	8	0.5385	1.8462	1
CJK - Campus JK	6	13	0.3833	0.6975	5.0202	0.4330	7	0.8667	3.0000	2

Notes: N = total number of samples; N_{anSSR} = number of alleles across four nuclear SSR loci; H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity; R_s = allelic richness; F_{IS} = inbreeding coefficient; N_{cpSSR} = number of alleles from chloroplast SSR loci; N_b = number of haplotypes; H_{rs} = haplotype richness; Prv = private haplotypes; * = significant deviations from HWE determined by a test implemented in MSA ($P < 0.005$).

Table 3

Analysis of molecular variance (AMOVA) and degrees of freedom (d.f.) revealed by four nuclear and four chloroplast SSR markers in localities of *E. magalhaesii*.

Source of Variation	d.f.	nSSR		d.f.	cpSSR	
		Sum of Squares	% variation		Sum of Squares	% Variation
Among localities	3	14.866	19.88	3	7.769	49.63
Within localities	74	65.518	80.12	35	8.949	50.37
Total	77	80.385		38	16.718	

Table 4

F_{ST} values per pairs of locations. The stars sign that the values are significant.

For population names see Table 1.

	CVM	ERA	EMV	CJK
CVM	x	0.84805*	0.02735*	0.62316*
ERA	0.20197	x	0.54788*	0.49474*
EMV	0.21232*	0.27953*	x	0.32039*
CJK	0.03257	0.42738*	0.11658*	x

* significant ($P < 0.001$)

CAPÍTULO 4 – História evolutiva e biogeografia de *Hohenbergia* (Bromeliaceae): extensiva diversidade morfológica e baixo sinal filogenético molecular

Rodrigo C. Gonçalves-Oliveira, Sascha Heller, Elton Martinez Carvalho Leme, Ana M. Benko-Iseppon, Maria das Graças L. Wanderley, Georg Zizka.

1. Introdução

Bromeliaceae é uma das famílias mais representativas e com diversidade específica nos neotrópicos, constituindo a maior família de monocotiledôneas essencialmente tropical (SMITH & DOWNS, 1974, 1977, 1979). Sua grande diversidade genética e específica está associada à sua evolução rápida e via radiação adaptativa, além de seleção divergente (GIVNISH, 1997, 2015). Dentre as suas adaptações podem ser citadas o mecanismo de fotossíntese CAM e a presença de fitotelma, especialmente presente nas subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae, sendo na primeira subfamília, tratadas como inovações-chave que estão associadas a altas taxas de especiação e baixas taxas de extinção, respectivamente (SILVESTRO *et al.*, 2014). Além disso, alguns grupos de Bromeliaceae apresentaram eventos de radiação adaptativa, como no processo de colonização das Bromelioideae no território leste brasileiro cerca de 3–5 Ma atrás (GIVNISH *et al.*, 2011).

Em relação à filogenia, as Bromeliaceae apresentam um histórico de baixo sinal filogenético em estudos moleculares realizados com diversos gêneros, de modo que as pesquisas iniciais a partir de um único gene têm sido insuficientes para delimitar com resolução satisfatória os clados demarcados a partir de filogenias construídas com dados morfológicos (TERRY *et al.*, 1997; HORRES *et al.*, 2000; CRAYN *et al.*, 2004). Entretanto as relações filogenéticas fundamentadas em evidências obtidas pelo gene *ndhF* foram eficientes para definir uma nova proposta de classificação infra-familiar em Bromeliaceae (GIVNISH *et al.*, 2007). Posteriormente a proposta de divisão da família foi confirmada a partir de uma análises multilocus com sequências cloroplastidiais (GIVNISH *et al.*, 2011). Análises filogenéticas a partir de dados obtidos por marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou sequenciamento multilocus foram efetivas na subfamília Tillandsioideae (BARFUSS *et al.*,

2005) e em gêneros como *Puya* Molina (JABAILY & SYTSMA, 2010, 2013), *Fosterella* L.B.Sm (REX *et al.*, 2007, 2009), *Orthophytum* Beer (LOUZADA *et al.*, 2014) e *Dyckia* Schult. & Schult.f. (KRAPP *et al.*, 2014). Em contrapartida, após extensivas tentativas, os estudos não apresentaram uma resolução satisfatória no posicionamento infragenérico de *Alcantarea* e *Ronnbergia*, onde os genes estudados apresentaram pouca variação, com árvores incluindo várias politomias (VERSIEUX *et al.*, 2012; AGUIRRE-SANTORO *et al.*, 2015).

As maiores dificuldades de delimitação genética em Bromeliaceae referem-se às Bromelioideae. Dificuldades na circuncisão nessa subfamília em análises filogenéticas moleculares recentes são destacadas por vários autores, principalmente no que tange ao grupo das *core*-Bromelioideae que inclui gêneros associados a *Aechmea*, onde comumente observam-se politomias (SCHULTE *et al.*, 2005, SCHULTE & ZIZKA, 2008; SCHULTE *et al.*, 2009; EVANS *et al.*, 2015). Posteriormente com o uso de análise como o gene *phyC* a resolução tendeu a ser mais efetiva, porém ainda não foi possível resolver o gênero *Aechmea* de maneira satisfatória, emergindo em análises como polifilético (SILVESTRO *et al.*, 2014).

O gênero *Hohenbergia* Schult & Schult.f. possui cerca de 65 espécies distribuídas entre o leste Brasileiro e florestas tropicais caribenhas. Está dividido em dois subgêneros (*Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* e *H.* subg. *Whitmackiopsis*) que são reconhecidos até o momento (SMITH & DOWNS, 1979). No Brasil sua ocorrência é restrita aos domínios da Floresta Atlântica e das Caatingas, sendo reportadas 45 espécies (FORZZA *et al.*, 2016). O gênero é bastante diverso morfológicamente, apresentando variação de hábito, incluindo espécies epifíticas, saxícolas ou terrícolas (BARACHO, 2003). Como em *Aechmea* as relações filogenéticas infragenéricas são pouco conhecidas e incipientes. Os estudos anteriores que incluíram o gênero utilizaram apenas uma espécie, sendo *H. stellata* Schult & Schult.f a mais representada (TERRY *et al.*, 1997; HORRES *et al.*, 2000; SCHULTE *et al.*, 2009). Mais recentemente em um estudo com *Aechmea* Ruiz & Pav. e gêneros associados, (SASS & SPECHT, 2010) fizeram uso de informações filogenéticas fornecidas a partir de dois genes cloroplastidiais e dois nucleares. Entre os genes nucleares apenas o gene ETS apresentou alguma informação filogenética para o gênero, sugerindo como resultado da filogenia o agrupamento dos dois subgêneros em clados separados, porém não houve resolução dentro de *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* (SASS & SPECHT, 2010). Além disso, um estudo subsequente com marcadores cloroplastidiais resultou em uma politomia para subgênero *Hohenbergia* e apontou uma relação entre os gêneros *Hohenbergia* e

Orthophytum (EVANS *et al.*, 2015). Apesar desses resultados, a hipótese mais aceita é o posicionamento de *Hohenbergia* no sub-clado das Bromelioideae, dentro das “*eu-bromelioideae*”, tendo como grupo irmão de *Aechmea* e muito próximo a *Canistrum* E. Morren (SCHULTE *et al.*, 2009).

Além das dificuldades encontrar um gene com sinal filogenético satisfatório nas Bromeliaceae, outra limitação está na forma pela qual os dados genéticos são abordados, seja pelo algoritmo utilizado ou pela maneira com que os dados são carregados nos programas. Assim, concatenar genes para uma filogenia pode gerar resultados tendenciosos se: (i) apresentarem histórias evolutivas diferentes; (ii) apresentarem características como taxas de extinção diferenciadas, ou ainda (iii) forem resultantes de hibridizações, transferência horizontal ou tiverem sofrido recombinação (DEGNAN & ROSENBERG, 2009). Tais dificuldades têm afetado análises em Bromeliaceae, uma vez que hibridizações e introgressões foram reportadas, por exemplo, em *Puya* e *Pitcairnia* L.Hér (JABAILY & SYTSMA, 2010; PALMA-SILVA *et al.*, 2011). Nesta situação novos algoritmos baseados em coalescência ou na montagem de redes filogenéticas têm sido indicados como métodos menos sensíveis às divergências na história evolutiva dos genes (*BEAST, HELED & DRUMMOND, 2010; PIRIE *et al.*, 2015).

Pesquisas atuais tentam testar as afirmações de Charles Darwin de que espécies que são filogeneticamente próximas tendem a possuir características ecológicas similares (LOSOS, 2008). Com base nessas pesquisas, ecologistas e evolucionistas modernos desenvolveram a teoria de que espécies filogeneticamente próximas tendem a ocupar o mesmo nicho ecológico, ou seja, tendem a habitar ambientes que apresentam similaridades com aqueles que suas espécies originárias habitavam (WIENS & GARAHAM, 2005), suportando a teoria de coalescência anteriormente citada. Sabe-se que a diferenciação de uma espécie (ou especiação) em várias linhagens tende a ocorrer devido a uma quebra no fluxo gênico entre duas linhagens, seja ela devido a fatores reprodutivos, de isolamento geográfico ou ecológico por especiação alopátrica, parapátrica ou simpátrica (BULTIN *et al.*, 2012). Fatores geográficos que geram uma quebra do fluxo gênico podem separar duas linhagens pela divergência de ambientes, o que é conhecido como evolução ecológica, a qual muitas vezes pode resultar em baixo sinal filogenético (LOSOS, 2008; RUNDEL & PRICE, 2008; BULTIN *et al.*, 2012).

No presente trabalho as hipóteses filogenéticas foram produzidas a partir de análises envolvendo cinco regiões gênicas, combinadas com estudos de modelagem de nicho. Com base

nas evidências levantadas, pretendeu-se: (i) esclarecer as relações filogenéticas infragenéricas no gênero *Hohenbergia* correlacionando seus representantes aos grupos de Bromelioideae através de análises de filogenia molecular; (ii) correlacionar os grupos obtidos com o que se conhece da diversidade e distribuição geográfica do gênero e (iii) inferir, à luz da filogenia, quanto à biogeografia histórica de grupos chave.

2. Materiais e Métodos

Coleta de material, dados de campo e isolamento de DNA

Espécimes de *Hohenbergia* e da subfamília Bromelioideae foram adquiridos em coletas de campo realizadas entre os anos de 2013 e 2015, na coleção de exemplares cultivados ex situ (Refúgio dos Gravatás) de Elton Leme em Teresópolis-RJ, bem como no Bromeliário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Dados de distribuição das espécies foram anotados durante expedições de coleta em campo ou obtidos de registros de herbários em visitas a 13 coleções nacionais e duas internacionais (ASE, UFP, HUEFS, IPA, R, RB, SP, HSP, CEPEC, HRB, ALCB, JPB, HB, NY e K).

Tecidos vegetais foliares foram acondicionados em gel de CTAB 98% com solução salina (ROGSTAD, 1992), sendo mantidos sob refrigeração até a extração das amostras. A extração do DNA total das amostras foi realizada a partir do protocolo CTAB descrito por Weising *et al.* (2005).

Amplificações e sequenciamento de DNA.

As amplificações ocorreram de acordo com o descrito por Silvestro *et al.* (2014), exceto para o gene *ETS* cujas reações procederam segundo o descrito por Sass & Spech (2010). As amplificações foram conduzidas em termociclador Verti Thermal Cycler (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com o Kit Dream-Taq® Thermo Fischer, utilizando-se de 10 - 20 ng/μL de concentração final de DNA-molde e 10 pmol de cada primer. O programa padrão utilizado foi o descrito por Silvestro *et al.* (2014) para o sequenciamento, sendo composto de uma desnaturação inicial de 2 min. a 95 °C seguida de 35 ciclos compostos por uma

desnaturação inicial (30 s), com 30 s para anelamento a 59 °C e 2 min. de fase de extensão a 70° C, seguindo-se de uma extensão final por 7 min. a 70 °C. Para as reações de sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye Terminator ® (Applied Biosystems) com reações de sequenciamento seguiram um programa de termociclador com 60 s de desnaturação inicial a 95 °C, por conseguinte 30 ciclos de 10 s a 96 °C para a desnaturação, 10 s para anelamento a 50 °C e 2 min de extensão a 60° C. As sequências foram geradas a partir do sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer do Sequenzierung Labor do BIK-F (Senckenberg, Frankfurt am Main, Germany). Foram sequenciados os genes nucleares *PhyC*, *ETS* e *AGT1* e duas subunidades do gene cloroplastidial *ycf1* (*ycf1_1* e *ycf1_6*). Algumas sequências foram adquiridas no NCBI. Nem todos os genes estão disponíveis para todas as espécies (Apêndice 1), sendo nesse caso tratados como “*missing data*”.

Tratamento das sequências, análises filogenéticas e reconstrução de caracteres.

As sequências foram alinhadas e tratadas no programa Geneious 7 (DRUMMOND *et al.*, 2011) seguindo de um emblocamento no programa Gblocks 0.1b (CASTRESANA, 2000). Cada gene foi carregado separadamente no programa jModelTest (POSADA, 2008) baseados na contagem de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1973) a fim de identificar o modelo de substituição mais adequado para cada um. Os modelos obtidos no jModelTest foram, para o gene *PhyC* *GTR + I*, para o gene *Agt1* *HKY+I+G*, o gene *ETS* *GTR + G*, subunidade 1 do gene *ycf1* *HKY +I +G* e a subunidade 6 *GTR + I + G*. As análises filogenéticas foram realizadas nos programas Mr. Bayes 3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012) RaxmlGUI (SILVESTRO & MICHALAK, 2012) e *BEAST (HELED & DRUMMOND, 2010). Para todos os programas os genes foram concatenados em um único arquivo, sendo que em cada documento de entrada foi indicada a definição de cada grupo de caracteres, informando o início e o fim de cada gene e o modelo de substituição a utilizar. Para a construção da árvore filogenética via análise de agrupamentos bayesianos (BI) realizada no Mr. Bayes foram calculadas 50 Mi de interações (MCMC) com um burnin de 500.000. No RaxmlGUI foi obtida uma árvore de Máxima Verossimilhança (ML) a partir de 2000 interações de Bootstrap. No programa *BEAST implementado no pacote do BEAST2.0 foram realizadas 500 Mi de interações, com um burnin de 1 000 000 sendo gerada uma árvore para cada gene e uma árvore para a espécie. O arquivo de entrada do *BEAST2.0 foi montado no

Beuti, sendo as árvores montadas no TreeAnnotator, disponível no pacote do BEAST 2.0. A visualização e tratamento das árvores foi realizada no programa TreeView (SALDANHA, 2004).

Para a reconstrução de ambientes ancestrais foi aplicado o algoritmo BBM (Bayesian Binary Method) no programa RASP (YU *et al.*, 2015). Apenas as árvores geradas pelo *BEAST foram utilizadas, sendo cada espécie codificada segundo o ecossistema em que ocorre, incluindo: a Floresta Atlântica *s.l.* (A), a região da Chapada Diamantina (B) e a Caatinga (C). Esses grupos eco-geográficos foram delimitados com base nas características ecológicas de cada ambiente. As análises bayesianas nesse algoritmo foram realizadas a partir de 92.000 árvores com 100000 gerações e burnin de 10000.

Tratamento dos dados de distribuição e modelagens de nicho

Os dados de distribuição foram tratados com editores de texto e carregados no pacote DISMO (HIJMANS *et al.*, 2012) disponível para R onde foram gerados modelos do tipo envelope (DOMAIN) e modelos do tipo “machine learning” (MAXENT v3.3.3k, PHILLIPS *et al.*, 2004, 2012). Foram testados modelos para as espécies *H. catinae* Ule. como representante do ecossistema Caatinga (representando o bioma das Florestas Semidecíduas Secas), *H. ramageana* Mez. de ampla distribuição na Floresta Atlântica (como bioma Floresta Tropical) e as espécies endêmicas da Chapada Diamantina *H. utriculosa* Ule, *H. pennae* E.Pereira, *H. vestita* L.B.Sm. e *H. leopoldo-hortsii* E.Gross, Rauh & Leme. Foram criados modelos para os períodos do último interglacial (LIG) (~140 Ka) último máximo glacial (LGM) (~22 Ka) e período do médio Holoceno (HOL) (-6ka). Os dados de cada espécie foram testados para os dados climáticos dos modelos CCSM4, MIROC-ESM e MPI-ESM-P na resolução de 5' disponíveis na base de dados do Worldclim (TAYLOR *et al.*, 2012) para os períodos LGM e HOL, sendo assim o modelo apresentado para esses períodos é resultado da média entre dois algoritmos (DOMAIN & MAXENT) e três modelos climáticos, portanto a média de seis modelos. Para o período LIG apresentamos a média entre o modelo gerado pelos algoritmos em dados disponíveis no Worldclim na resolução de 30” (OTTO-BLIESNER *et al.*, 2008). Cada modelo foi gerado com base nas camadas 1 – Média da temperatura anual, 5 – Temperatura máxima nos meses mais quentes, 6 – Temperatura mínima nos meses mais frios, 12 – Precipitação anual, 13 – Precipitação no mês mais úmido e 18 – Precipitação nos meses mais frios. Estas camadas foram

escolhidas com base no proposto por Collevatii devido à importância da temperatura e precipitação e sua correlação com a disponibilidade de água, tanto para ambientes muito úmidos como a Floresta Atlântica ou muito secos como a Caatinga. Os valores de AUC e Kappa foram utilizados para caracterizar a qualidade dos modelos.

3. Resultados

Filogenia de *Hohenbergia*

Os genes concatenados e alinhados resultaram em um alinhamento em bloco contendo 3854 caracteres (*PhyC* 1157 pb, *AGT1* 422 pb, *ETS* 489 pb, *ycf1_1* 906 pb e *ycf1_6* 880 pb). Todas as análises recuperaram *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* como uma linhagem monofilética, excluindo-se as espécies *H. littoralis* L.B.Sm e *H. castellanosii* LB.Sm & Read. e *H.* subg. *Whitmackiopsis*, as quais foram recuperadas em um clado separado, porém ambas dentro do grupo das *Eubromelioideae*, posicionando-se entre espécies de gêneros próximos (Fig. 1).

A delimitação do clado *Hohenbergia* é suportada pela análise de Máxima verossimilhança com um bootstrap de 58, nas análises bayesianas por um coeficiente de probabilidade posterior no Mr. Bayes de 0.61 ao passo que as análises de coalescência no *BEAST apontaram para um suporte de 0.99 (Fig. 1). As árvores do RaxmlGUI e Mr. Bayes são mostradas no apêndice 2 e 3. O agrupamento de *H. castellanosii* e *H. littoralis* em um ramo à parte também apresentou suporte considerável (RaxmlGUI/ML = 75; Mr. Bayes/BI = 0.99, *BEAST/CO = 0.99). O clado *Whitmackiopsis* por sua vez apresentou suportes mais baixos (RaxmlGUI/ML = 50; Mr. Bayes/BI = 0.50, *BEAST/CO = 0.59), estando relacionado com *Hohenbergiopsis guatemalensis* L.B.Sm. e *Ursulea tuitensis* (Magaña & E.J.Lott) Read & Baensch, *Aech. lingulata* (L.) Baker e *Ronnbergia carvalhoi* Martinelli & Leme, todas endêmicas da região do Caribe, formando assim um clado caribenho (Fig. 1). Por consequência este grupo se separou do clado brasileiro, que compreendeu as demais *Hohenbergia*. Entretanto, os valores de suporte infragenérico para o gênero *Hohenbergia* foram bastante baixos, tanto nas análises de máxima verossimilhança como nas bayesianas. Apesar disso, alguns grupamentos regionais no grande clado *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* foram observados com algum

suporte na análise de coalescência, sendo três cladogramas delimitados, um contendo a maior parte das espécies, um segundo que incluiu *H. horrida* Harms e *H. ridleyi* (Baker) Mez. (ambas restritas à margem norte do Rio São Francisco e Planalto da Borborema) e um terceiro clado incluindo espécies do sudeste da Bahia e da Floresta Atlântica da região Sudeste do Brasil (Fig. 2).

Reconstrução de ambiente ancestral

Os dados de reconstrução de ambiente ancestral delimitam a Floresta Atlântica como ecossistema de origem das *Hohenbergia* brasileiras, ocorrendo três colonizações da Caatinga, sendo: (1) no sul e sudoeste da Bahia ao norte de Minas Gerais com *H. conquistensis* Leme, *H. rosea* L.B.Sm & Read e *H. flava* Leme & C.C.Paula; (2) uma segunda onda de colonização com *H. catingae* e (3) uma terceira nas regiões do Planalto da Borborema com *H. horrida* e *H. ridleyi*. A região da Chapada Diamantina também apresentou duas colonizações a partir da Floresta Atlântica. Os dados de reconstrução de caracteres revelaram que a linhagem principal do subgênero *Hohenbergia* é originária da Floresta Atlântica, havendo sucessivas colonizações da Caatinga e da Região da Chapada Diamantina. (Fig. 3). *H. castellanosi* e *H. littoralis* também apresentaram origem na Floresta Atlântica, mantendo o padrão do gênero como hoje circunscrito (dados não apresentados graficamente).

Modelagem de nicho

Os dados de modelagem obtidos apresentaram bons valores de AUC e Max Kappa (Apêndice 4). Todos os modelos foram cuidadosamente visualizados e corroboram com o modelo médio obtido. De um modo geral o modelo DOMAIN apresentou a possibilidade de ocorrência em áreas marginais ao modelado principal gerado pelo MAXENT (Apêndice 5).

Os modelos médios obtidos para *H. ramageana* (Fig 4A, 4B e 4C) suportam a ocorrência da espécie para as zonas de contato entre Floresta Atlântica e Caatinga, indicando que sua área de ocorrência foi reduzida com as mudanças climáticas pleistocênicas a aglomerados marginais longitudinais com maior probabilidade de ocorrência na Floresta Atlântica do sudeste da Bahia e leste dos estados de Pernambuco e Alagoas, situação que permaneceu no máximo holocênico.

Por sua vez, a espécie *H. catingae* (Fig 4D, 4E e 4F) manteve sua distribuição durante os 140 mil anos de história que aqui modelamos, havendo variações apenas nas regiões limítrofes de distribuição Sul e Norte, bem como ao longo do tempo com expansões a sul no período pleistocênico e a norte no máximo holocênico. Vale observar que na região diretamente relacionada à margem sul do baixo São Francisco as condições climáticas passaram a ser favoráveis à ocorrência de *H. catingae* no período Holocênico. Os modelos gerados para as espécies endêmicas da Chapada Diamantina (Fig. 4G, 4H e 4I) teriam uma distribuição modelada para regiões ao norte e a sul da distribuição original, incluindo algumas áreas como o Planalto da Borborema e o espinhaço Mineiro; entretanto, a distribuição dessas espécies passou a ser mais restrita aos platôs da Chapada Diamantina. A distribuição atual de todas as espécies de *Hohenbergia* aqui testadas se restringe à Margem esquerda do médio São Francisco, e a ambas as margens do baixo São Francisco.

4. Discussão

Relações filogenéticas entre as *Hohenbergia* e grupos relacionados

A história filogenética de *Hohenbergia* se confunde com a de outros taxa do core-Bromelioideae, em especial com o gênero *Aechmea* em sua delimitação atual. As árvores de coalescência resultaram em um forte viés geográfico nos agrupamentos das Bromelioideae. Grupamentos geográficos em filogenias já foram reportados para a subfamília Bromelioideae (SASS & SPECHT, 2010; AGUIERRE-SANTORO *et al.*, 2015), bem como para os gêneros *Dyckia* (Pitcairnioideae) (KRAPP *et al.*, 2014) e *Puya* (Puyoideae) (JABAILY & SYTSMA, 2010). De fato, os grupos delimitados pela morfologia apresentam diversos caracteres homoplásticos e baixo suporte filogenético (SASS & SPECHT, 2014; AGUIERRE-SANTORO *et al.*, 2015), sugerindo-se que o agrupamento das *Hohenbergia* e das Bromelioideae deva ser interpretado à luz da evolução e das províncias biogeográficas delimitadas por Givnish *et al.* (2011).

É atribuída à subfamília Bromelioideae uma baixa diversidade genética e um sinal filogenético muito baixo (SCHULTE *et al.*, 2009; SASS & SPECHT, 2010; AGUIERRE-SANTORO *et al.*, 2015; EVANS *et al.*, 2015), corroborando com o observado no presente

estudo. Em especial observa-se que o sinal filogenético em *Hohenbergia* é excepcionalmente baixo, uma vez que as análises de máxima verossimilhança (ML) e bayesiana (BI) apresentaram suportes muito baixos e uma organização muito confusa das espécies do subg. *Hohenbergia*. De modo similar, estudos anteriores que incluíram o subgênero falharam em delimitar com suporte qualquer relação filogenética infragenérica (SASS & SPECHT, 2010; EVANS *et al.*, 2015). A aplicação de um método de coalescência para a montagem de uma árvore filogenética permitiu a delimitação de alguns clados com algum suporte (Fig. 1). Um bom suporte foi observado em alguns clados, como o que incluiu as espécies *H. littoralis* e *H. castellanosii* que se agruparam com outras Bromelioideae do leste brasileiro e devem compor uma outra linhagem filogenética dentro das Bromelioideae. De fato *H. littoralis* foi descrita como *Aechmea itapoana* (MORAWETZ & TILL, 1981), dependendo a circunscrição desse clado em uma nova combinação de estudos mais aprofundados comparativamente às demais *Aechmea*. Ambas as espécies são restritas ao território baiano nas proximidades da capital Salvador, incluindo espécies que ocorrem em ambientes de Floresta Atlântica e Restinga. Estudos citogenéticos preliminares realizados por nosso grupo de trabalho evidenciaram algumas características citogenéticas divergentes em *H. castellanosii* (Ximenes, com. pess.).

No grande clado do subg. *Hohenbergia* destaca-se um grupamento que inclui espécies de Floresta Atlântica do sudeste da Bahia e do Sudeste Brasileiro, correspondendo a uma linhagem evolutiva do subgênero.

Outro grupamento compreendeu *H. ridleyi* e *H. horrida*, duas espécies de Floresta Atlântica e brejos de altitude do nordeste setentrional, ao norte do Rio São Francisco. Grupamentos filogenéticos/geográficos contendo apenas espécies da região do norte do São Francisco que incluem *H. stellata* Schult. & Schult.f. foram observados em um estudo com Bromelioideae em especial com o grupo *Portea/Gravisea* (HELLER *et al.*, 2015).

Um papel de barreira geográfica tem sido atribuído ao Rio São Francisco em sua porção no domínio da Floresta Atlântica no que tange à evolução de algumas espécies arbóreas (SANTOS *et al.*, 2007), o que pode se aplicar também ao grupo aqui analisado.

As espécies *H. penna* e *H. igatuensis* Leme apresentaram um suporte razoável de agrupamento, sendo ambas originárias da região de Igatu e Mucugê na Chapada Diamantina. A árvore consenso entre 100000 árvores amostradas aponta para uma topologia que delimitou com suporte muito baixo um grande clado que agrupa a maioria das espécies endêmicas da Floresta

Atlântica do sul da Bahia. Sendo um ramo com bom suporte para espécies baianas de regiões de Floresta Atlântica e regiões limítrofes da Caatinga (*H. brachycephala*, *H. correia-araujoii*, *H. undulatifolia* e *H. reconcanvensis*). Agrupa ainda espécies de ampla distribuição e diversidade morfológica como *H. catingae* e *H. ramageana* (BARACHO, 2003). Esta área do Sul da Bahia, onde ocorre a maioria dos endemismos, é reconhecida como refúgio do período pleistocênico para espécies de Floresta Atlântica (CARNAVAL & MORITZ, 2008).

O subgênero *Whitmackiopsis* apresentou bons suportes em sua delimitação, porém não apresentou suporte em suas relações infragenéricas. Trata-se de um grupo que já foi bem estudado e discutido em filogenias anteriores (SASS & SPECHT, 2010; SILVESTRO *et al.*, 2014; EVANS *et al.*, 2015). Diante das evidências filogenéticas/evolutivas reportadas e observadas no presente estudo, acreditamos que há evidências suficientes para estabelecer o subgênero *Wittmackiopsis* em um novo gênero fora de *Hohenbergia*.

Biogeografia e evolução das *Hohenbergia*.

De fato, a Floresta Atlântica é um dos domínios biogeográficos delimitados por Givnish *et al.* (2011) como centro de diversificação das Bromelioideae no leste brasileiro. As adaptações citadas de Fisiologia CAM e presença de tanques são características compartilhadas também pelas *Hohenbergia* (SILVESTRO *et al.*, 2014; GIVNISH *et al.*, 2014). Essas duas adaptações são relacionadas à habilidade de ocupar nichos onde a disponibilidade de água é menor, como nos hábitos epifítico e rupícola (SILVESTRO *et al.*, 2014). Nossos resultados estimam que o ancestral das *Hohenbergia* tenha emergido do grupo principal das Bromelioideae como uma linhagem nos últimos quatro milhões de anos na Floresta Atlântica (*sensu* GIVNISH *et al.*, 2011), tratando-se assim de um grupo evolutivamente recente.

Linhagens que derivaram recentemente tendem a tornar-se mais susceptíveis às variações climáticas do período pleistocênico, gerando populações isoladas que geraram divergências microevolutivas, como observado em *Vriesea gigantea* Gaudich. (PALMA-SILVA *et al.*, 2009), *Pitcairnia geyskesii* L.B.Sm. (BOISELIEUR-DUBAYLE *et al.*, 2010) e em *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) (PINHEIRO *et al.*, 2014). Espera-se que espécies em linhagens de rápida evolução apresentem pouca diferenciação filogenética e conservação de nicho (LOSOS, 2008). O fluxo gênico interespecífico quando ocorre pode propiciar eventos de hibridização e

introgressão entre espécies próximas, como reportado para *Pitcairnia* (PALMA-SILVA *et al.*, 2011), deturpando análises filogenéticas. Pouco se sabe quanto à presença de híbridos entre *taxa* de *Hohenbergia*, mas a detecção de cromossomos B em *H. utriculosa* e *H. igatuensis* sugere que a evolução nesses grupos seria bastante ativa (revisado por GITAÍ *et al.*, 2014).

Se existe conservação de nicho entre espécies próximas como sugerem Wiens & Garahan (2005) os modelos de nicho devem apresentar os mesmos espaços ou uma distribuição em intersecção. Sendo assim, as espécies de Floresta Atlântica devem ter apresentado uma distribuição mais ampla em direção à Caatinga. Os resultados observados nos modelos de *H. ramageana* corroboram com uma distribuição mais ampla no período interglacial, havendo probabilidade de expansão para as zonas marginais da Caatinga mais próximas à Floresta Atlântica (Figura 4A). Um agrupamento de *H. ramageana* com espécies da Chapada Diamantina sugere que esta espécie apresenta relações com aquelas ocorrentes nos campos rupestres. A flora da Chapada Diamantina apresenta componentes de diversos domínios vizinhos, como Cerrados, Floresta Atlântica e Caatinga, sendo reconhecida como uma região de ecótono, por vezes incluída na definição de Floresta Atlântica *s.l.* ou Caatinga (CONCEIÇÃO & PIRANI, 2005; VELLOSO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009). A modelagem de nicho para *H. ramageana* não sugere a presença da espécie na Chapada Diamantina, contrariando evidências dadas pelo citado agrupamento. Entretanto, o ancestral comum entre *H. ramageana* e as demais espécies do clado corrobora com uma porcentagem de probabilidade de origem na Floresta Atlântica, sugerindo que esta espécie estaria intimamente relacionada a este clado. Um isolamento posterior dessas populações pode ter contribuído para a separação dessas linhagens durante o período de glaciação. Um fator agravante é que *H. ramageana* representa uma espécie muito polimórfica fenotipicamente, cuja delimitação taxonômica é difícil. Seu material tipo foi descrito em fruto e indicado como sendo muito similar à espécie *H. ridleyi* (SMITH & DOWNS, 1979). Além disso, as outras análises de ML e BI não agrupam *H. ramageana* com espécies da Chapada Diamantina. Assim, estudos populacionais e de cunho taxonômico devem ser conduzidos para definir melhor o posicionamento desta espécie, a fim de evitar identificações errôneas.

Como discutimos acima, os grupamentos filogenéticos de *Hohenbergia* com padrões geograficamente organizados sugerem uma evolução recente e conservação de nicho entre linhagens próximas. Situação semelhante se aplica a *H. catingae*, que apresentou flutuações nas áreas de ocorrência no período pleistocênico, sugerindo a hipótese de que as variedades da

espécie que hoje observamos (FORZZA *et al.*, 2016) sejam morfotipos oriundos das flutuações pleistocênicas com significativa plasticidade fenotípica, possivelmente resultantes de isolamento reprodutivo ou devido a outros caracteres ecológicos, como a distribuição de polinizadores. No entanto a espécie *H. catinae* apresentou uma distribuição restrita à Caatinga sugerindo que este domínio apresentou poucas flutuações desde o último período interglacial corroborando com outros estudos de modelagem climática realizados (WERNECK *et al.*, 2011; COLEVATTI *et al.*, 2013).

O modelo realizado com as espécies endêmicas da Chapada Diamantina sugere um caso especial onde ocorreu uma redução dos ambientes apropriados para sua ocorrência. Indicam também um isolamento parcial das espécies em pequenas populações sob os platôs de altitude da Chapada Diamantina no período atual (~6 ka). Este isolamento parcial pode ser o responsável pela presença de cromossomos B em *H. utriculosa* e *H. penna* (COTIAS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2000; CEITA *et al.*, 2008), ambas espécies endêmicas e simpátricas da Chapada Diamantina.

Os resultados aqui gerados de reconstrução de ambiente ancestral sugerem diversas colonizações e diversificação de *Hohenbergia* a partir da Floresta Atlântica para a Caatinga e a Chapada Diamantina. Modelos climáticos realizados para a Caatinga e a Floresta Atlântica sugerem áreas estáveis para ambos os ambientes, ocorrendo contrações e expansões dos dois domínios um em direção ao outro com as mudanças de temperatura (CARNAVAL & MORITZ, 2008; WERNECK *et al.*, 2011; COLEVATTI *et al.*, 2013). É sugerido que os brejos de altitude (enclaves de Floresta Atlântica em meio à Caatinga) representem remanescentes de uma expansão da Floresta Atlântica e uma ponte de ligação com a Floresta Amazônica (ANDRADE-LIMA, 1982; SANTOS *et al.*, 2007). Nossos resultados combinados de *H. catinae* e *H. ramageana* sugerem uma expansão das espécies de *H. ramageana* durante o último período interglacial e suportam a presença de *H. catinae* nesses ambientes. Por sua vez, *H. ramageana* como hoje circunscrita, apresenta um hábito facultativo, sendo comumente encontrada como epífita (LEME & SIQUEIRA-FILHO, 2008) mas também como planta terrestre, o que sugere haver ambientes adequados à presença da espécie de Floresta Atlântica no domínio da Caatinga.

Nossos resultados ainda indicam que *Hohenbergia* compreende um grupo com evolução recente. Além disso, propõe-se que as relações entre floras de Floresta Atlântica e Caatinga e as flutuações na distribuição dos biomas durante a última glaciação representaram um importante papel na evolução recente de *Hohenbergia*, como proposto para outras Bromelioideae.

Novos marcadores, com ênfase para aqueles de origem nuclear, bem como novas metodologias de sequenciamento multilocus em nível genômico devem auxiliar no refinamento desta primeira filogenia do grupo, especialmente ajudando na definição dos clados terminais, em nível específico.

5. Referências

- AGUIRRE-SANTORO, J et al. Is *Ronnbergia* (Bromeliaceae, Bromelioideae) a geographically disjunct genus? Evidence from morphology and chloroplast DNA sequence data. **Phytotaxa**, v. 219, n. 3, p. 261-275, 2015.
- ANDRADE-LIMA, D. de. Present-day forest refuges in northeastern Brazil. **Biological diversification in the tropics**, p. 245-251, 1982.
- AKAIKE, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. Pp. 267–281 in Proceedings of the second international symposium on information theory. Akademiai Kiado, Budapest.
- BARFUSS, M. H. J. et al. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 337–351, 2005.
- BARACHO, G. S. Revisão Taxonômica de *Hohenbergia* Schultt & Schult. f. subg. *Hohenbergia* (Bromeliaceae). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- BOISSELIER-DUBAYLE, M. C. et al. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana - a test of the forest refuge hypothesis. **Ecography**, v. 33, n. 1, p. 175–184, 2010.
- BUTLIN, R. et al. What do we need to know about speciation? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 1, p. 27–39, 2012.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, 2008.

- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.
- CEITA, G.O. et al. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, p. 189–193, 2008.
- COLLEVATTI, R. G. et al. Drawbacks to palaeodistribution modelling□: the case of South American seasonally dry forests. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 345–358, 2013.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de Habitats em Campos Rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: Substratos, Composição Florística e Aspéctos Estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 85–111, 2005.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P. et al. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 173–177, 2000.
- CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3703–3708, 2004.
- DEGNAN, J. H.; ROSENBERG, N. A. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. 6, p. 332–340, 2009.
- DRUMMOND, A. J. et al. Geneious v5. 4. 2011.
- EVANS, T. M. et al. Phylogenetic Relationships in Bromeliaceae Subfamily Bromelioideae based on Chloroplast DNA Sequence Data. **Systematic Botany**, v. 40, n. 1, p. 116–128, 2015.
- FORZZA, R.C. et al. *Hohenbergias* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128482>>. Acesso em: 02 Fev. 2016
- GITAÍ, J. et al. Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, p. 349–368, 2014.

- GIVNISH, T. J. Adaptive radiation and molecular systematics: issues and approaches. **Molecular evolution and adaptive radiation**, p. 1-54, 1997.
- GIVNISH, T. J. Adaptive radiation versus “radiation” and “explosive diversification”: why conceptual distinctions are fundamental to understanding evolution. **The New Phytologist**, v. 207, n. 2, p. 297–303, 2015.
- GIVNISH, T. J. et al. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 55–78, 2014.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical Biogeography of Bromeliaceae Inferred From *ndhF* Sequence Data. **Alisio**, v. 23, p. 3 – 26, 2007.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872–895, 2011.
- HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 3, p. 570-580, 2010.
- HELLER, S. et al. Elucidating Phylogenetic Relationships in the *Aechmea* Alliance□: AFLP Analysis of *Portea* and the *Gravisia* Complex (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Systematic Botany**, v. 40, p. 716–725, 2015.
- HIJMANS, Robert J. et al. DISMO: Species distribution modeling. **R package version 0.8-17**, 2013.
- HORRES, R. et al. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: Evidence from trnL(UAA) intron sequences of the chloroplast genome. **Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 306–315, 2000.
- JABAILY, R. S.; SYTSMA, K. J. Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): Placement, major lineages, and evolution of Chilean species. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 2, p. 337–356, 2010.
- JABAILY, R. S.; SYTSMA, K. J. Historical biogeography and life-history evolution of Andean *Puya* (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 201-224, 2013.

- KRAPP, F. et al. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 7, p. 1591–1614, 2014.
- LOSOS, J. B. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. **Ecology Letters**, v. 11, n. 10, p. 995–1003, 2008.
- LOUZADA, R. B. et al. Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 77, n. 1, p. 54–64, 2014.
- MORAWETZ, W.; TILL, W. *Aechmea itapoana*, a New Species from Bahia (Brazil): Taxonomy and Ecology. **Plant Systematics and Evolution**, v. 138, n. 1981, p. 275–281, 1981.
- OTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P. et al. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 173–177, 2000.
- OTTO-BLIESNER, B. L. et al. Simulating Arctic Climate Warmth and Icefield Retreat in the Last Interglaciation. n. March, p. 1751–1754, 2006.
- PALMA-SILVA, C. et al. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, v. 103, n. 6, p. 503–512, 2009.
- PALMA-SILVA, C. et al. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 15, p. 3185–3201, 2011.
- PHILLIPS, S. et al. A brief tutorial on Maxent. **Lessons in Conservation**, v. 3, p. 107-135, 2012.
- PHILLIPS, S. J.; DUDÍK, M.; SCHAPIRE, R. E. A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: **Proceedings of the twenty-first international conference on Machine learning**. ACM, 2004. p. 83.

- PINHEIRO, F. et al. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 49, p. 1 – 15, 2014.
- PIRIE, M. D. Phylogenies from concatenated data: Is the end nigh? **Taxon**, v. 64, n. JUNE, p. 1–4, 2015.
- REX, M. et al. AFLP analysis of genetic relationships in the genus *Fosterella* L . B . Smith (Pitcairnioideae , Bromeliaceae). **Genome**, v. 105, p. 90–105, 2007.
- REX, M. et al. Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.51, 3, p.472-485, 2009.
- RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest□: How much is left , and how is the remaining forest distributed□? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.
- ROGSTAD, S. H. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. **Taxon**, p. 701-708, 1992.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.
- RUNDELL, R. J.; PRICE, T. D. Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. 7, p. 394–399, 2009.
- SALDANHA, A. J. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. **Bioinformatics**, v. 20, n. 17, p. 3246-3248, 2004.
- SANTOS, M. M. et al. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. **Journal of Biogeography**, v. 34, p. 437–446, 2007.
- SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 2, p. 559–571, 2010.

- SCHUHE, K.; ZIZKA, G. Multi locus plastid phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) and the taxonomic utility of petal appendages and pollen characters. **Candollea**, v. 63, n. 2, p. 209–225, 2008.
- SCHULTE, K.; BARFUSS, M. H. J.; ZIZKA, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 2, p. 327–339, 2009.
- SCHULTE, K.; HORRES, H.; ZIZKA, G. Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). **Senckengeriana**, v. biologica, p. 113–125, 2005.
- SILVESTRO, D.; ZIZKA, G.; SCHULTE, K. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). **Evolution**, v. 68, n. 1, p. 163-175, 2014.
- SILVESTRO, D.; MICHALAK, I. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 12, n. 4, p. 335-337, 2012.
- SIQUEIRA FILHO, J.A.; LEME, E. M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: biodiversidade, conservação e suas bromélias**. Andrea Jakobsson Estúdio, 2006.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Flora neotropica monograph no. 14. (Pitcairnioideae)(Bromeliaceae). New York, New York Botanical Garden for Organization for Flora Neotropica, 1974
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Flora neotropica monograph: no. 14, part 3. Bromelioideae (Bromeliaceae). New York, New York Botanical Garden for Organization for Flora Neotropica p. 1493-2142, 1979.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). New York, New York Botanical Garden for Organization for Flora Neotropica ,1977.
- TAYLOR, K .E., STOUFFER, R.J.;G.A. MEEHL: An Overview of CMIP5 and the experiment design.” **Bulletin of the American Meteorological Society**, 93, 485-498, 2012.

- TERRY, R. G.; BROWN, G. K. ; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. **American Journal of Botany**. v.84, 5, p.664–670, 1997.
- VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PEREYNA, F. G. C. (eds). 2002. Ecorregiões – Proposta para o bioma Caatinga. Recife: Associação de plantas do Nordeste, 81p.
- VERSIEUX, L. M. et al. Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 177–189, 2012.
- WEISING, Kurt et al. **DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications**. CRC press, 2005.
- WERNECK, F. P. et al. Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests □: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidence. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, p. 272–288, 2011.
- WIENS, J. J.; GRAHAM, C. H. Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, n. 1, p. 519–539, 2005.
- YU, Y. et al. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 87, p. 46-49, 2015.

6. Figuras

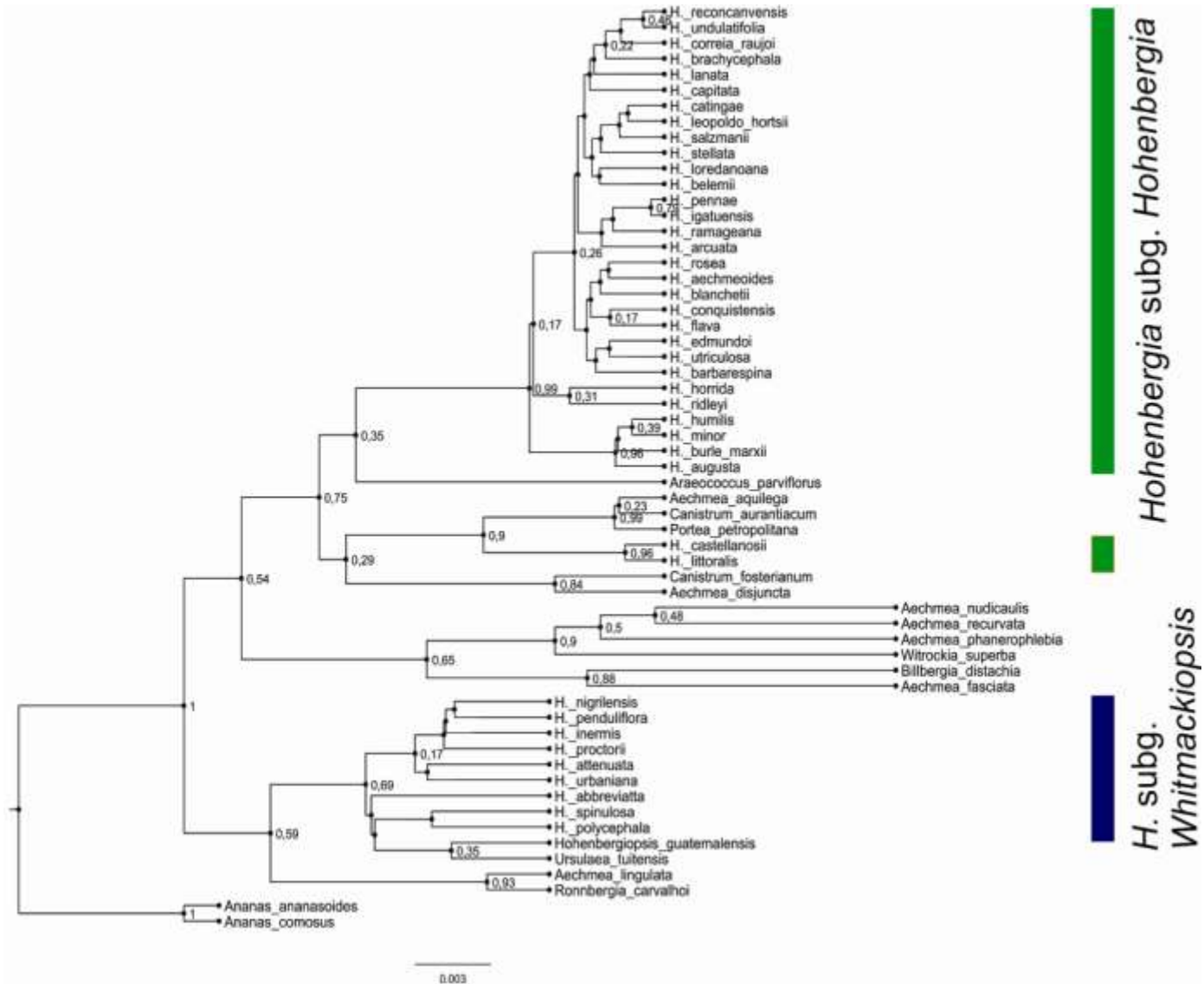


Figura 1 – Árvore filogenética bayesiana obtida no programa *BEAST pelo método de coalescência (CO). Os valores dos ramos representam a probabilidade posterior. As barras laterais marcam os dois subgêneros de *Hohenbergia*. *H. subg. Hohenbergia* é marcado na cor verde. Observe que este se apresenta como uma linhagem filogenética polifilética.

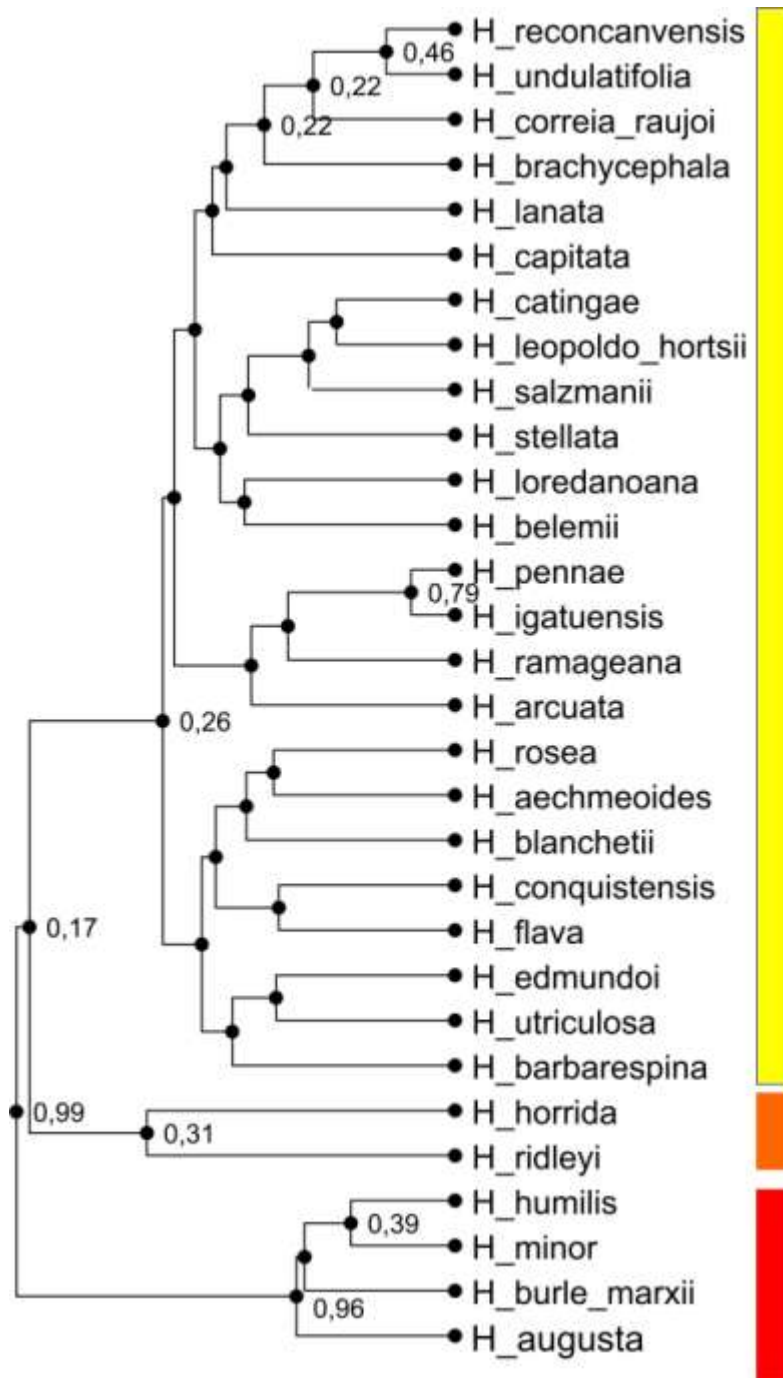


Figura 2. Grupamento *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* s.s. extraído da Figura 1. Os três subclados marcados com barras laterais, sendo em amarelo o subclado que inclui a maioria das espécies; em laranja as espécies de *H. horrida* e *H. ridleyi* originárias da margem norte do Rio São Francisco e um terceiro subclado (em vermelho), menos relacionado, p qual inclui as espécies de Floresta Atlântica com distribuição mais a sul além de *H. humilis*.

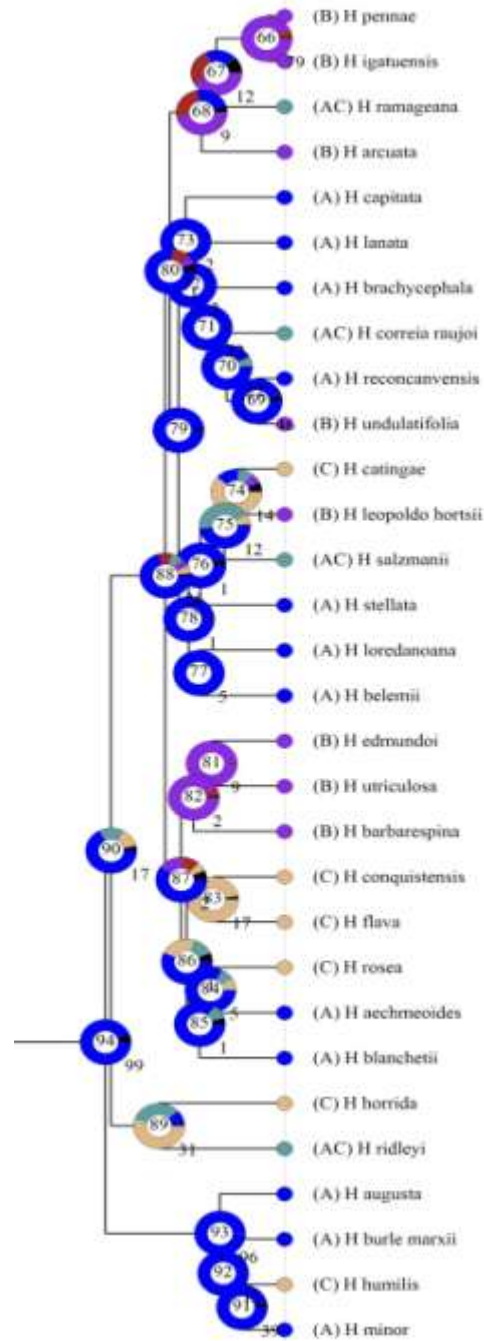


Figura 3 – Reconstrução de ambiente ancestral (Modelo BBM – RASP) para o clado das *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia*. A - Floresta Atlântica (azul). B – Chapada Diamantina (lilás). C - Caatinga (amarelo). AC – Floresta Atlântica e Caatinga (verde). O ancestral comum do grupo é originário da Floresta Atlântica

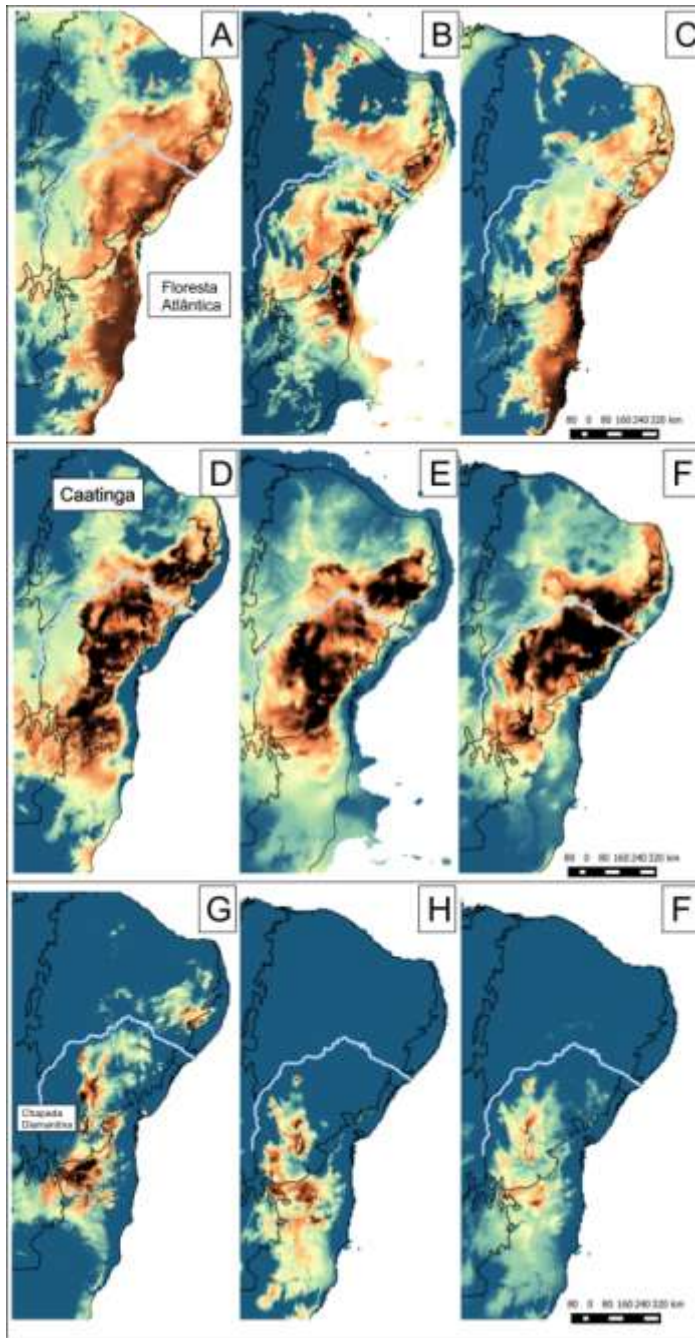


Figura 4 – Modelos medianos de modelagem climática de nicho dos algoritmos DOMAIN e MAXENT para *H. ramageana*, *H. cattingae* e *Hohenbergia* spp. endêmicas da Chapada Diamantina na região leste brasileira. A linha azul-clara representa o Rio São Francisco. A- Modelo para *H. ramageana* no período do último interglacial (140 Ka). B – *H. ramageana* no período do último máximo glacial (~22 Ka). C – Modelo de *H. ramageana* para o período do ótimo de temperatura do holocênico (~6Ka). D- Modelo para *H. cattingae* no período do último interglacial (140 Ka). E – *H. cattingae* no período do último máximo glacial (~22 Ka). F – Modelo de *H. ramageana* para o período do ótimo de temperatura do holocênico (~6 Ka). G- Modelo para *Hohenbergia* spp. da Chapada Diamantina no período do último interglacial (140 Ka). H – *Hohenbergia* spp. da Chapada Diamantina no período do último máximo glacial (~22 Ka). I – Modelo de *Hohenbergia* spp. da Chapada Diamantina para o período do ótimo de temperatura do holocênico (~6 ka).

7. Apêndice 1 – Lista das espécies, genes e tamanho das sequencias.

Taxon	Tamanho Geral	Num.	PhyC	Agt1	ETS	ycf1_1	ycf1_6
Aech fasciata	160 2 bp	2				816	786
Aechmea disjuncta RC	170 8 bp	2	967			741 (1 indels)	
Androlepsis	145 4 bp	2				736	718
BB040 H pennaie	347 7 bp	5	1080	166	445	906	880
BE031 A recurvata	340 7 bp	4	1132		489	906	880
BE066 Portea petropolitana	361 8 bp	5	1157	205 (2 indels)	489	904 (1 indels)	863
BE070 Canistrum aurantiacum	385 2 bp	5	1157	422 (2 indels)	487	906 (1 indels)	880 (30 indels)
BE077 Canistrum fosterianum	379 7 bp	5	1157	422 (11 indels)	487	853	878
BE101 Aechmea aquilega	385 1 bp	5	1157	421 (2 indels)	489	906 (1 indels)	878 (30 indels)
BE103 Wittrockia superba	377 6 bp	5	1157	422 (6 indels)	489 (3 indels)	828	880
BE147 H capitata	206 4 bp	3	1154	421	489		
BE147 Hohenbergia capitata	168 7 bp	2				820	867
BE156 Aechmea lingulata	329 1 bp	4	1151 (1 indels)	422 (7 indels)		838 (1 'N', 1 indels)	880
BE174 Aechmea nudicaulis	384 0 bp	5	1157	422 (4 indels)	489 (15 indels)	893	879
BE201 Ronnbergia carvalhoi	343 0 bp	4	1157		489	906 (1 indels)	878
BE210 Ananas anasoides	336 5 bp	4	1157	422 (6 indels)		906	880
BE217 H catignae	178 2 bp	2				902	880
BE222 H edmundoi	379 1 bp	5	1157	421	489	885	839
BE224 H lanata	357 1 bp	5	1157	154	489	892	879
BE229 H loredanoana	383 5 bp	5	1157	422	485	892	879

Apêndice 1 Continuação

BE233 H stellata	375 7 bp	5	1070	422	489 (1 indels)	897	879
BE234 Billbergia distachia	330 8 bp	4	1157	422 (3 indels)		906	823 (6 indels)
BE235 H conquistensis	384 3 bp	5	1157	422	487	906	871
BE296 H barbaespina	378 1 bp	5	1157	422	432	890	880
BE298 H utriculosa	260 4 bp	4	1082	167	487		868
BE319 H augusta	332 0 bp	4	1157	422		861	880
BE357 H pennae	198 5 bp	3	1076	422 (2 indels)	487		
BE358 H stellata	193 2 bp	3	1023	422	487 (1 indels)		
BE374 Aechmea phanerophlebia	376 7 bp	5	1157	422 (4 indels)	424	888 (1 indels)	876 (30 indels)
BE382 H belemii	383 8 bp	5	1157	422	487	906	866
BE420 Ananas comosus	379 0 bp	5	1095 (1 indels)	422 (6 indels)	487	906	880
BE455 Ursulea tuitensis	371 3 bp	5	1016 (1 indels)	422 (6 indels)	489 (32 indels)	906	880
BE456 H leopoldo hortsii	178 6 bp	2				906	880
BE470 H leopoldo hortsii	354 7 bp	5	1082	234 (2 indels)	445	906	880
BE472 H pennae	376 1 bp	5	1076	422	489	906	868
BE523 H burle marxii	379 5 bp	5	1106 (2 indels)	422	487 (1 'N')	902	878
BE553 H lanata	178 6 bp	2				906	880
BE556 H humilis	286 5 bp	4	1076	422	487		880
BE564 H rosea	287 2 bp	4	1083	422	487		880
BE570 Hohenbergiopsis guatemalensis	269 5 bp	4		422 (6 indels)	487	906	880
BE571 H brachycephala	355 3 bp	5	1082	198	487	906	880
BE599 H aechmeoides	251 8 bp	4	1085	170	387		876
BE645 Araeococcus parviflorus	374 0 bp	5	1070	422 (1 indels)	489 (23 indels)	899	860

Apêndice 1 Continuação

H abbreviatta	129 3 bp	2	1056		237		
H aechmeoides	171 3 bp	2				833 (1 indels)	880
H arcuata	226 0 bp	4		159	485	736	880
H attenuata	489 bp	1			489		
H augusta 6757	171 3 bp	2				833 (1 indels)	880 (2 indels)
H augusta sn	178 6 bp	2				906 (1 indels)	880 (1 indels)
H barbarespina EL	275 5 bp	3	1157			906 (1 indels)	692 (1 indels)
H belemii EL	192 6 bp	2	1093			833 (1 indels)	
H blanchetii 5732	214 5 bp	4		172	460	800 (1 indels)	713
H blanchetii IL	360 9 bp	5	1157	422	317	833 (1 indels)	880
H brachycephala RC	320 7 bp	4	1138 (7 'N', 12 indels)		473	906 (1 indels)	690 (10 indels)
H burle marxii EL	144 5 bp	2	1157		288		
H castellanosi 8588	282 7 bp	4	928		443	755 (1 indels)	701
H castellanosi MUC	465 bp	1			465		
H catingae CAT	101 5 bp	2		308 (2 indels)		707	
H catingae GLO	251 5 bp	4	577 (1 indels)	398		827 (1 indels)	713
H catingae LGA	159 bp	1		159			
H catingae MPT	178 9 bp	3		422		651	716
H catingae PIR	153 8 bp	3		212 (1 indels)		601	725
H catingae QUM	132 8 bp	2		422 (2 indels)		906 (1 indels)	
H conquistensis EL	144 4 bp	2	1157		287		
H correia araujoi RC	364 8 bp	5	1157 (3 indels)	422	489	881 (1 indels)	699
H flava 3720	127 9 bp	2			489		790
H horrida BMD1	186	3	600 (1		468		792

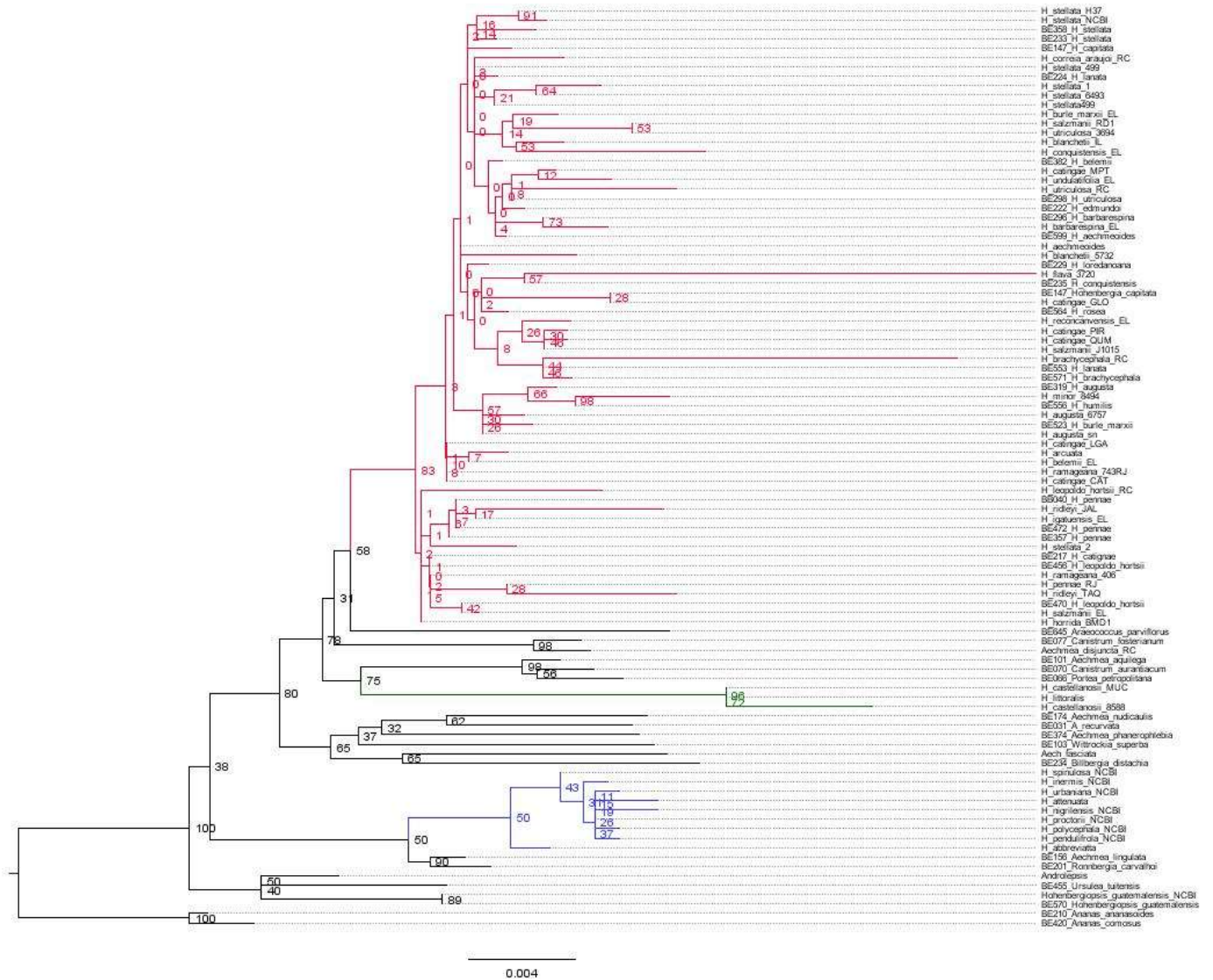
Apêndice 1 Continuação

	0 bp		indels)				
H igatuensis EL	321 3 bp	4	1157 (1 indels)		445	735	876 (1 indels)
H inermis NCBI	450 bp	1			450		
H leopoldo hortisii RC	197 0 bp	3		422 (3 'N', 2 indels)		833 (1 indels)	715
H littoralis	138 3 bp	2				689 (1 indels)	694 (1 indels)
H minor 8494	315 8 bp	5	619 (1 indels)	422 (3 indels)	475	896 (1 indels)	746 (1 indels)
H nigrilensis NCBI	489 bp	1			489		
H pendulifrola NCBI	115 7 bp	1	1157				
H pennae RJ	276 7 bp	4	1157 (1 indels)	184		733	693
H polycephala NCBI	115 7 bp	1	1157				
H proctorii NCBI	164 6 bp	2	1157		489		
H ramageana 406	535 bp	1					535
H ramageana 721RJ	144 2 bp	2				736	706
H ramageana 743RJ	142 7 bp	2				742 (1 indels)	685
H reconcanvensis EL	355 9 bp	5	1157	422 (2 'N')	450	791	739
H ridleyi JAL	136 4 bp	2				649 (1 indels)	715
H ridleyi TAQ	287 0 bp	5	619	208 (3 indels)	454	906	683
H salzmanii EL	987 bp	1	987 (2 indels)				
H salzmanii J1015	145 4 bp	2				744	710
H salzmanii RD1	157 1 bp	3	674 (1 indels)	162		735	
H spinulosa NCBI	489 bp	1			489		
H stellata 1	140 7 bp	2	1157		250 (2 'N')		
H stellata 2	165 8 bp	3	1011	165		482 (1 'N', 1 indels)	
H stellata 499	878 bp	1					878

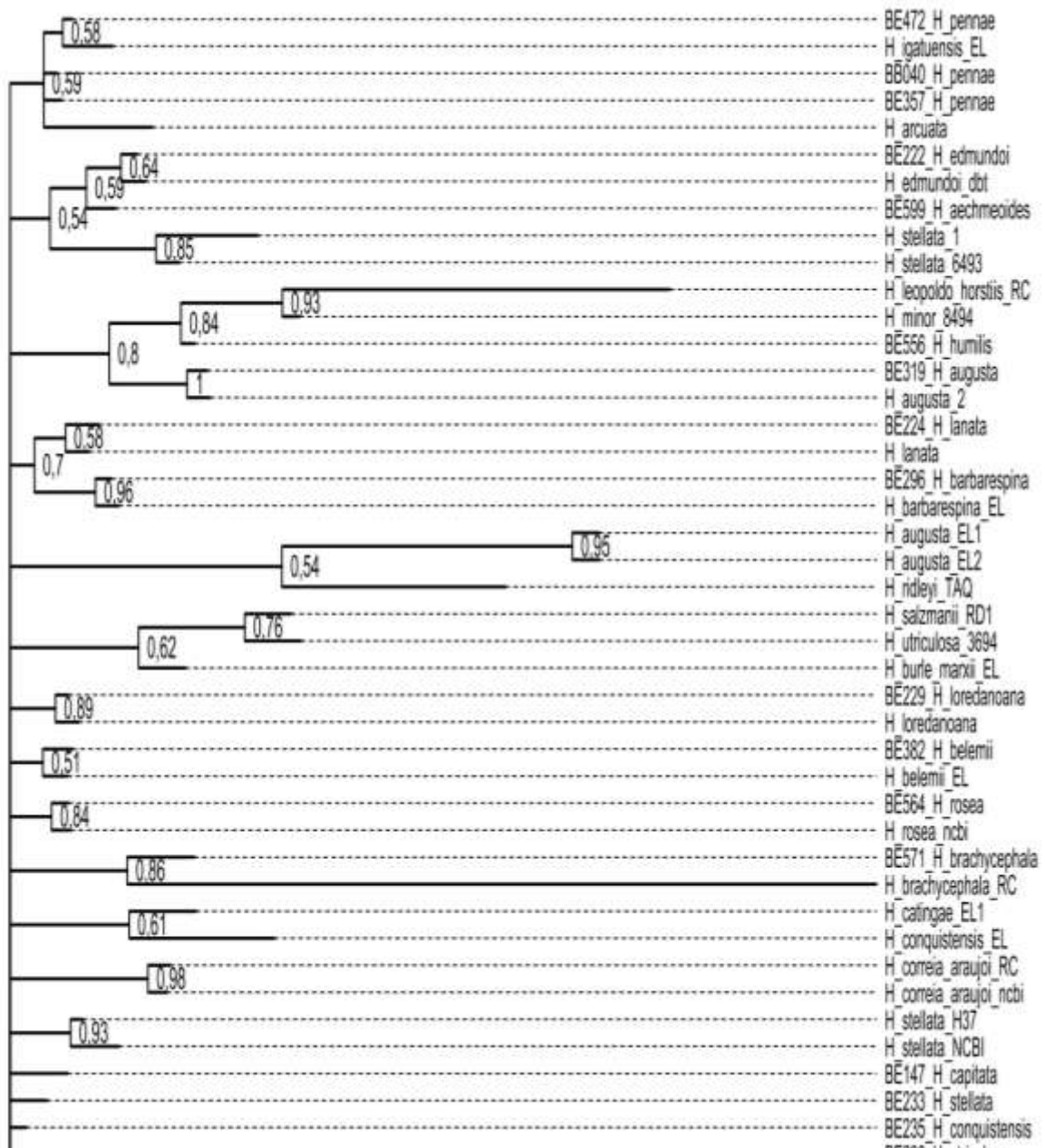
Apêndice 1 Continuação

H stellata 6493	286 6 bp	3	1157			833 (1 indels)	876
H stellata H37	164 4 bp	2	1157			487 (1 indels)	
H stellata NCBI	162 9 bp	2	1157			472 (1 indels)	
H stellata499	182 8 bp	2	1094			734	
H undulatifolia	143 4 bp	2				699	735
H undulatifolia EL	167 3 bp	3	928 (4 indels)	422	323		
H urbaniana NCBI	115 7 bp	1	1157				
H utriculosa 3694	237 8 bp	4	619 (1 indels)			283	716 760
H utriculosa RC	136 6 bp	2	1157 (1 indels)	209			
Hohenbergiopsis guatemalensis NCBI	164 6 bp	2	1157			489	

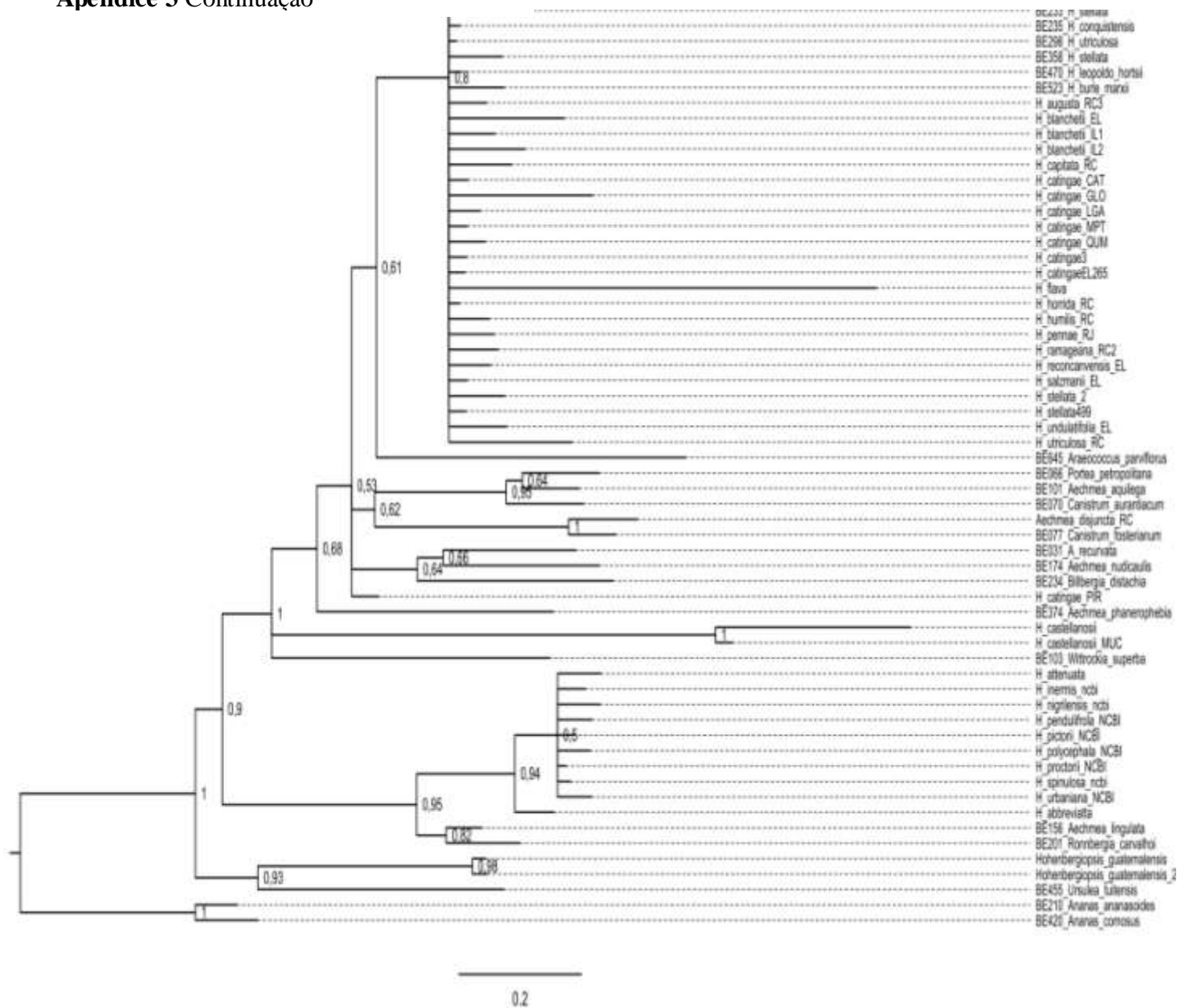
8. Apêndice 2 - Árvore de Máxima Verossimilhança (ML) gerada pelo programa RaxmlGUI. Destacamos - Vermelho – *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* Azul – *H.* subg. *Wittmackiopsis* Verde – *H. castellanosi* e *H. littoralis*.



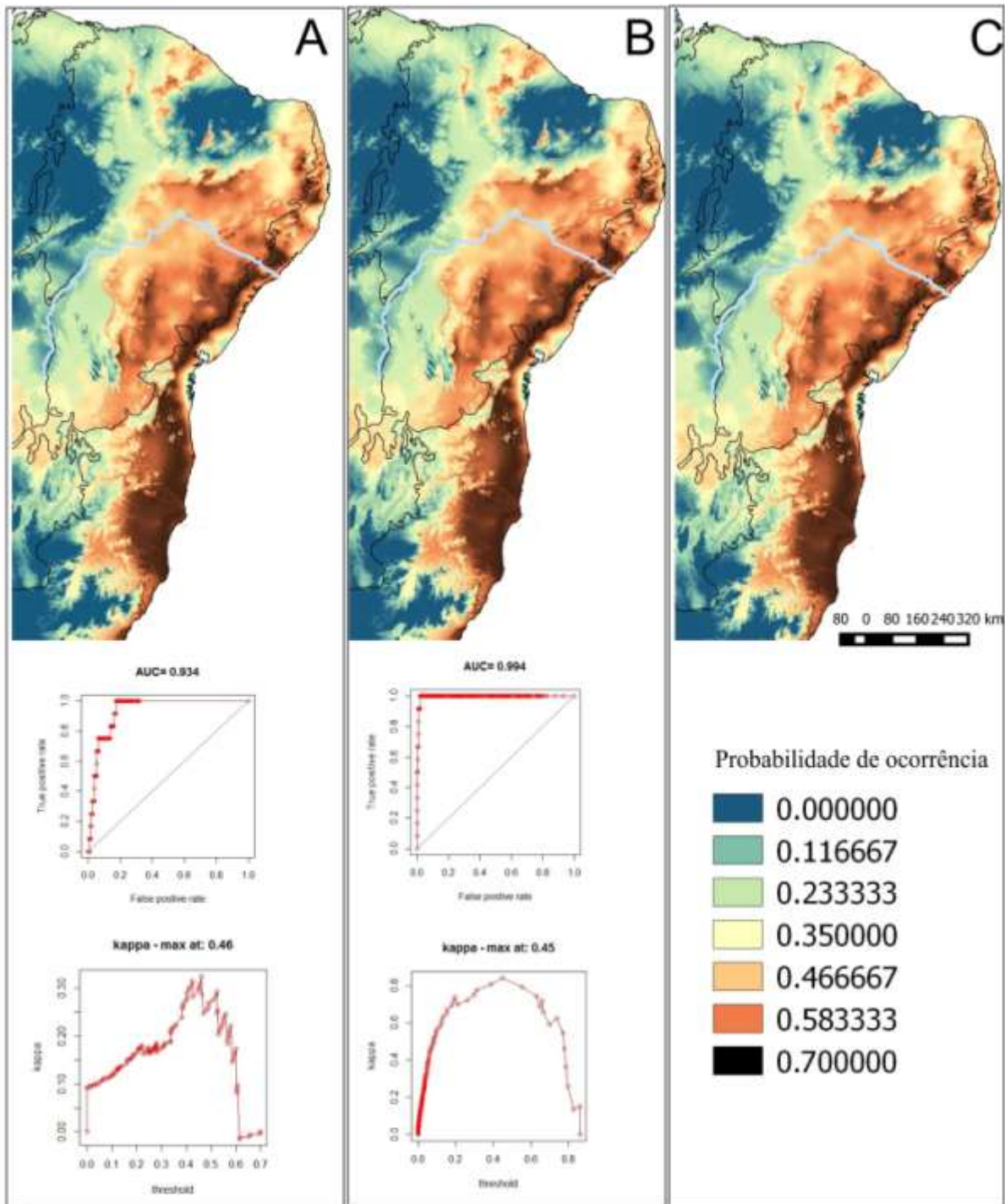
9. Apêndice 3 - Árvore Bayesiana gerada pelo programa Mr. Bayes.



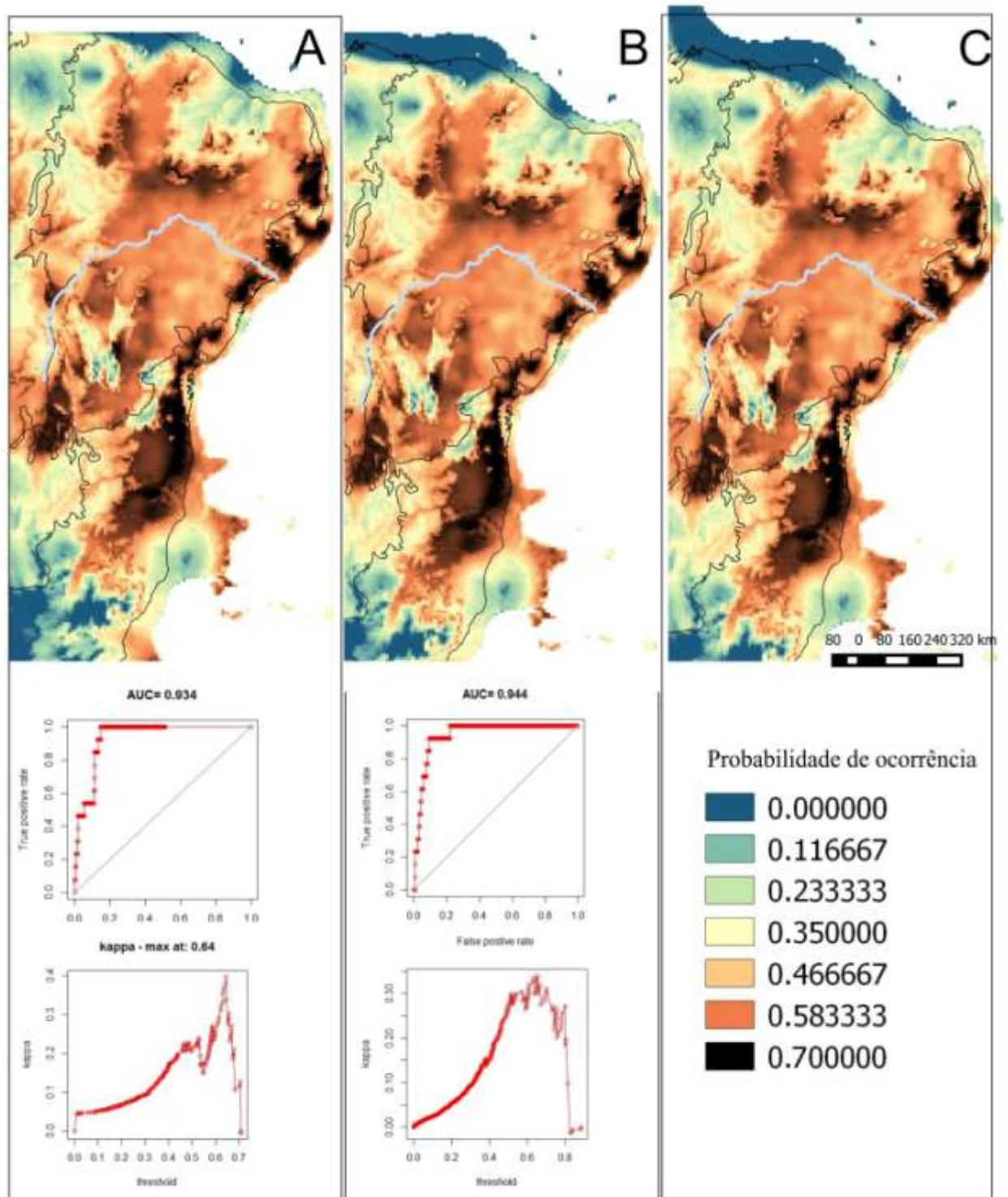
Apêndice 3 Continuação



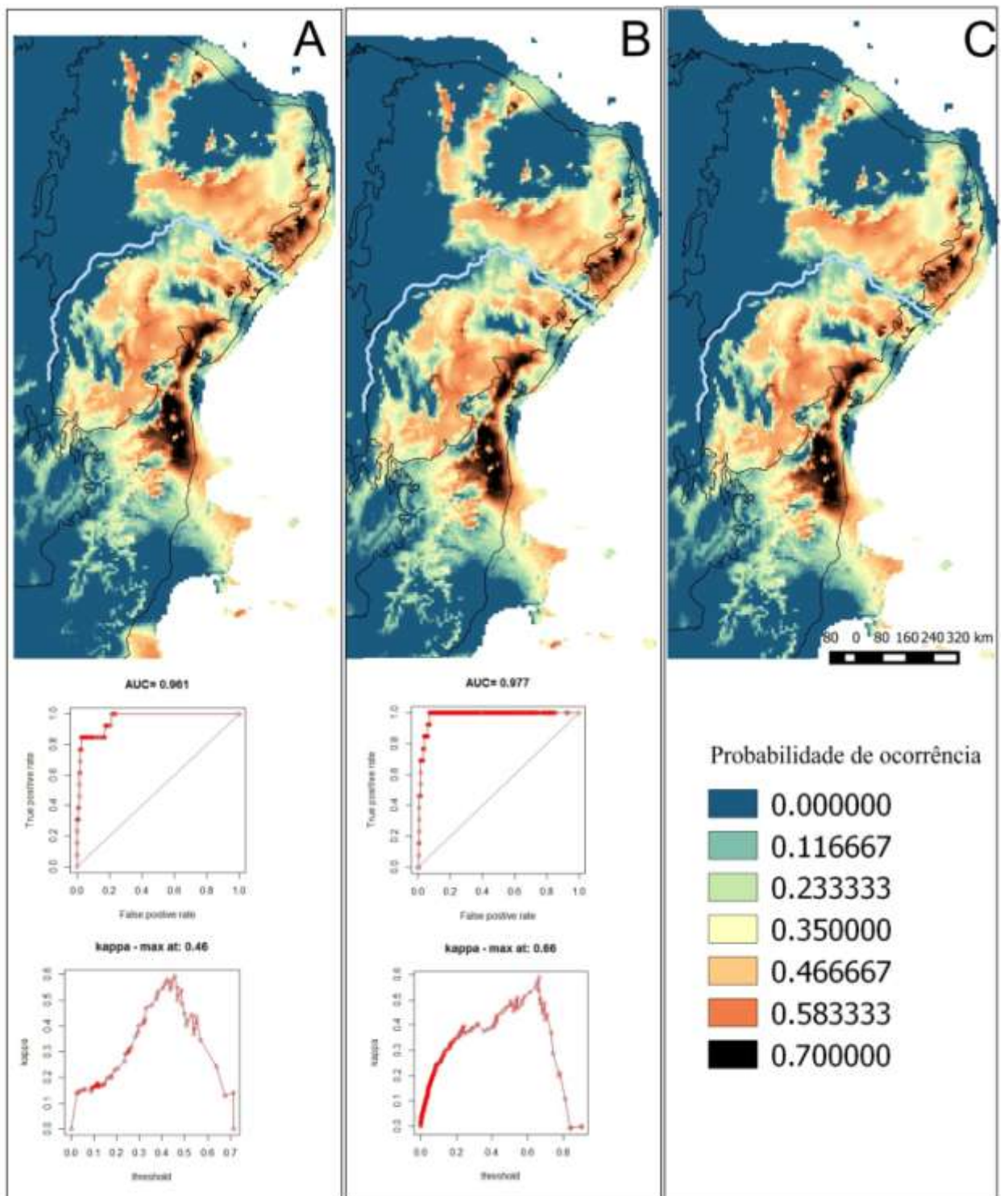
Apêndice 4 – Mapas intermediários para a montagem dos modelos, os gráficos de AUC e Kappa são apresentados para cada modelo.



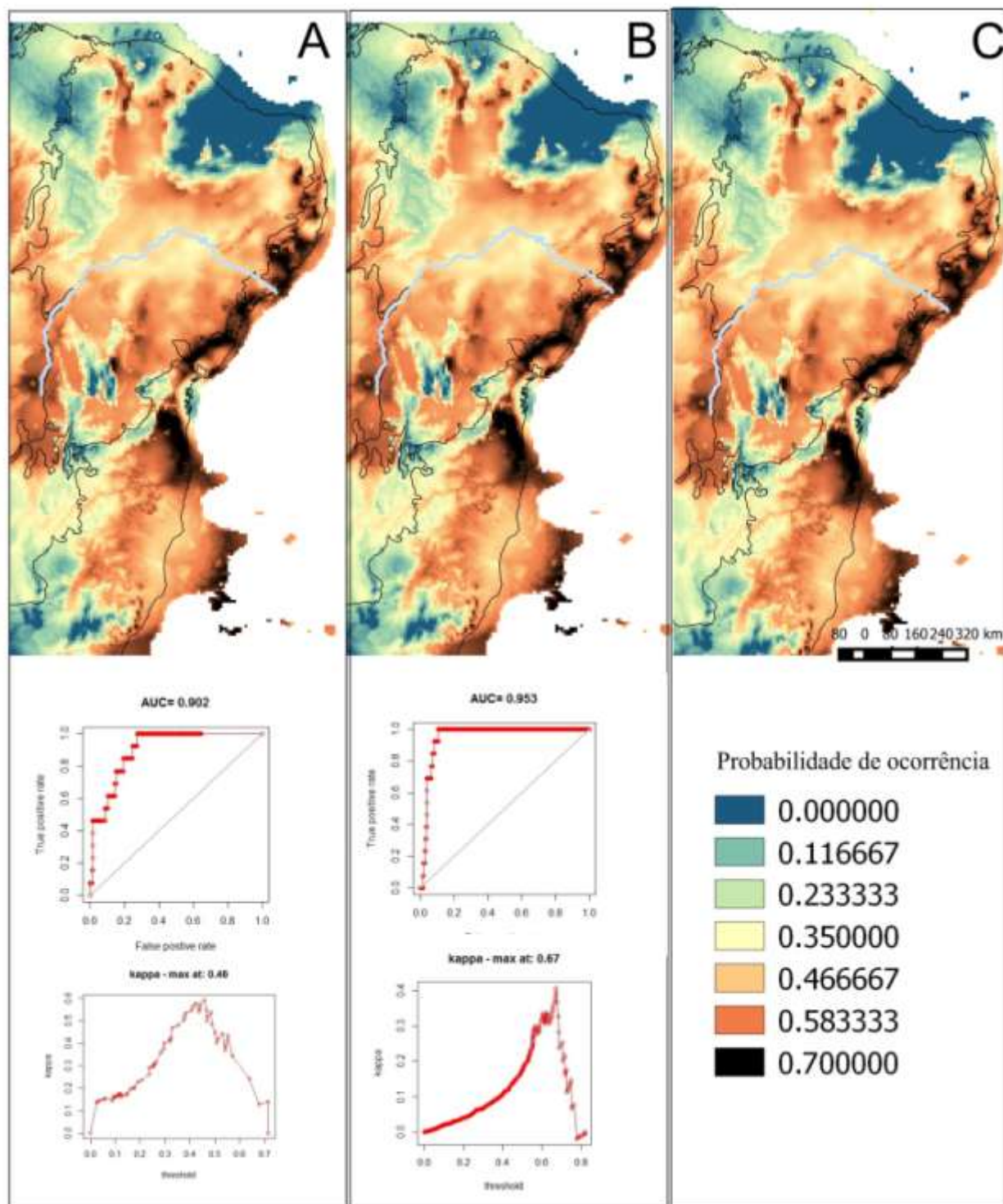
Apêndice 4.1 - *H. ramageana* - Interglacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



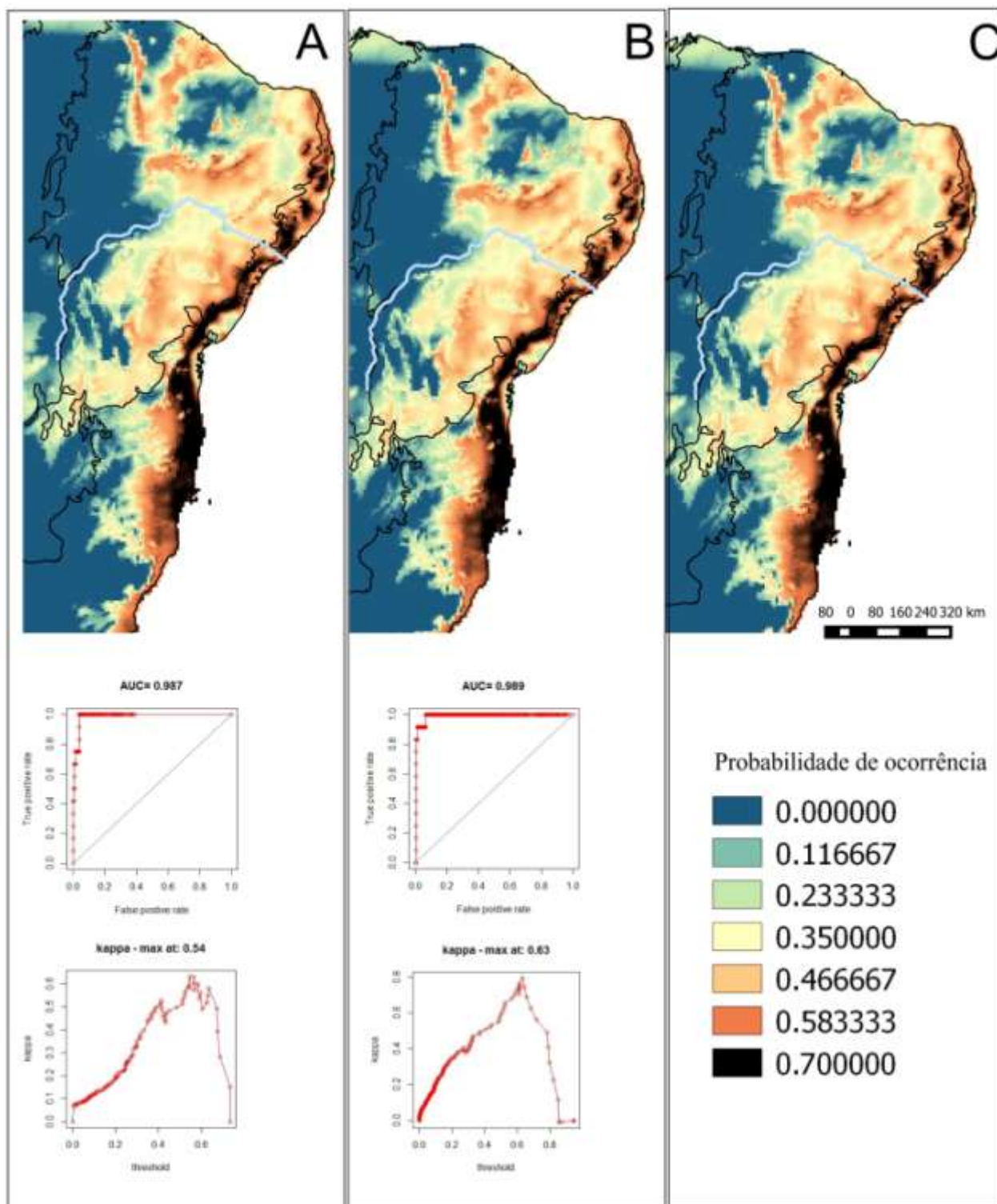
Apêndice 4.2 - *H. ramageana* - CC - Último máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



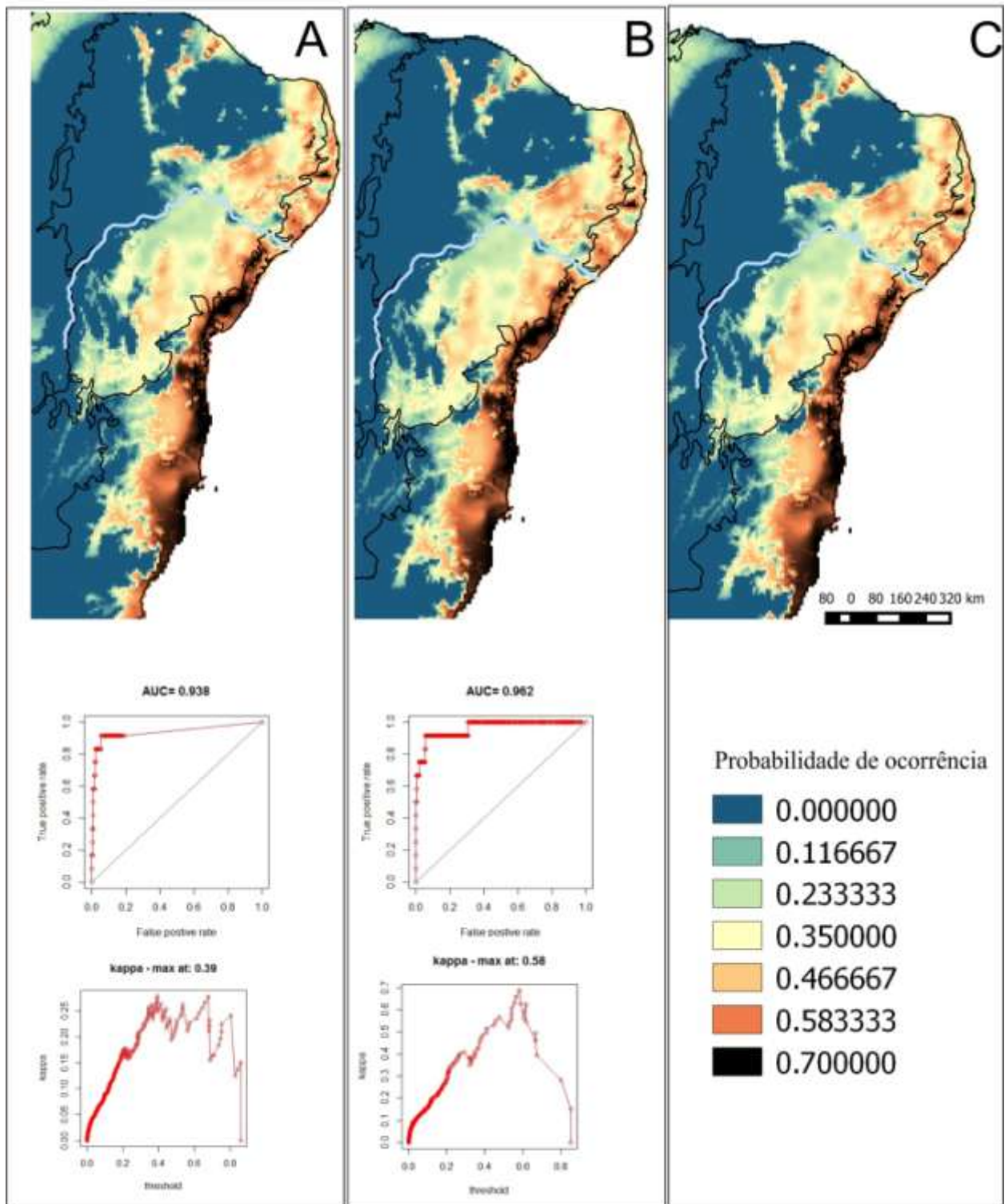
Apêndice 4.3 - *H. ramageana* - ME - Ultimo máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



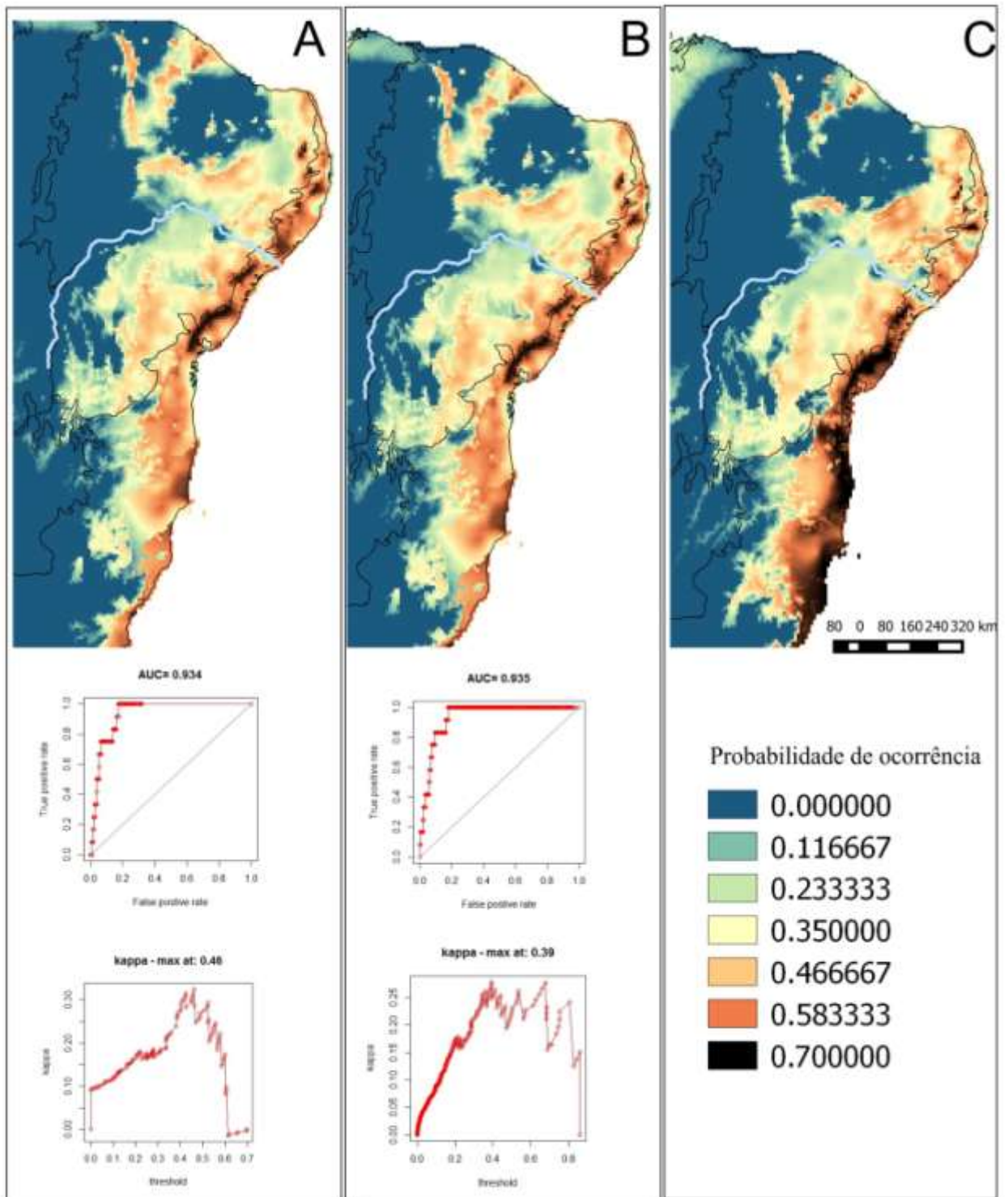
Apêndice 4.4 - *H. ramageana* - MR - Último máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



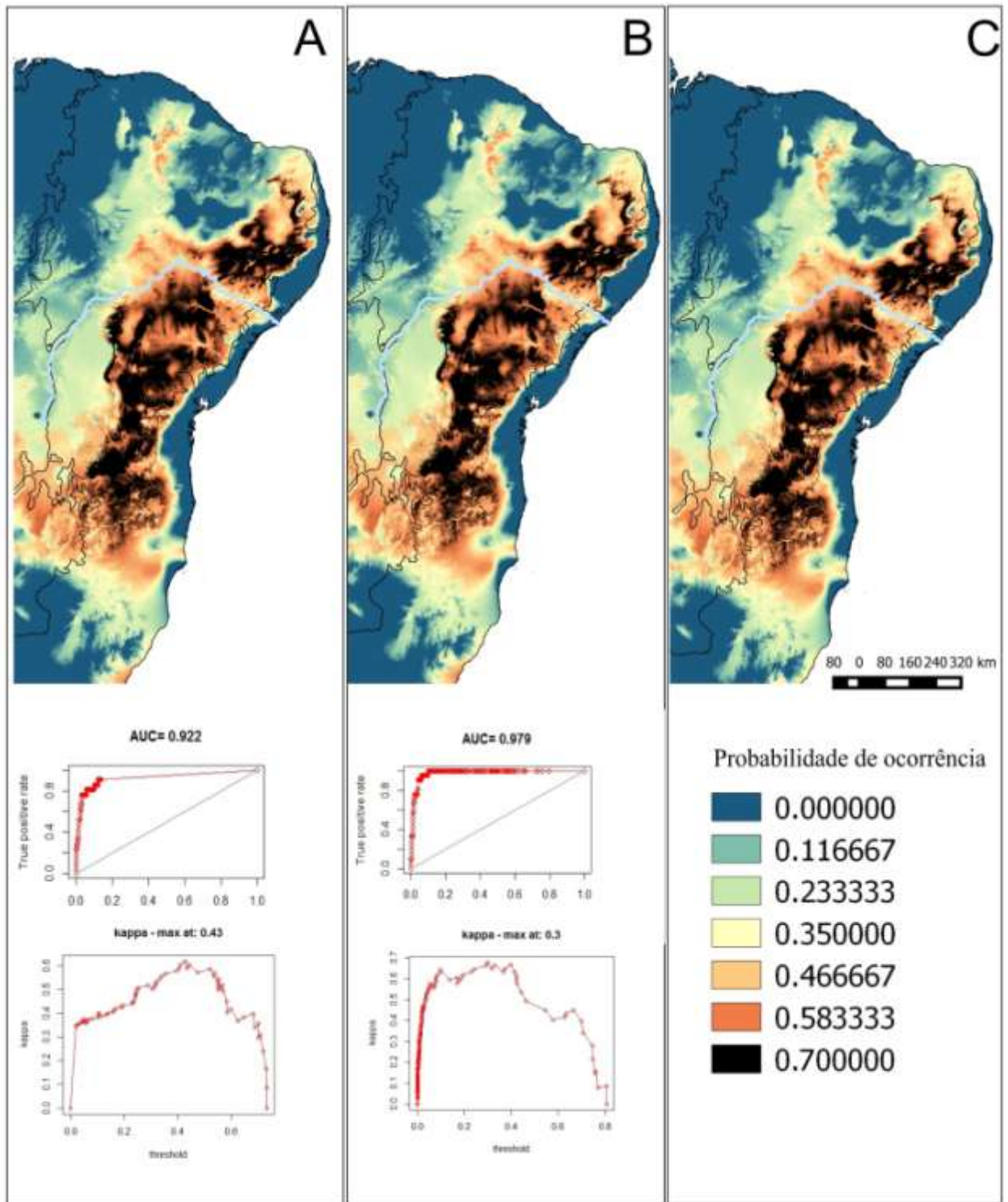
Apêndice 4.5 - *H. ramageana* - CC - Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



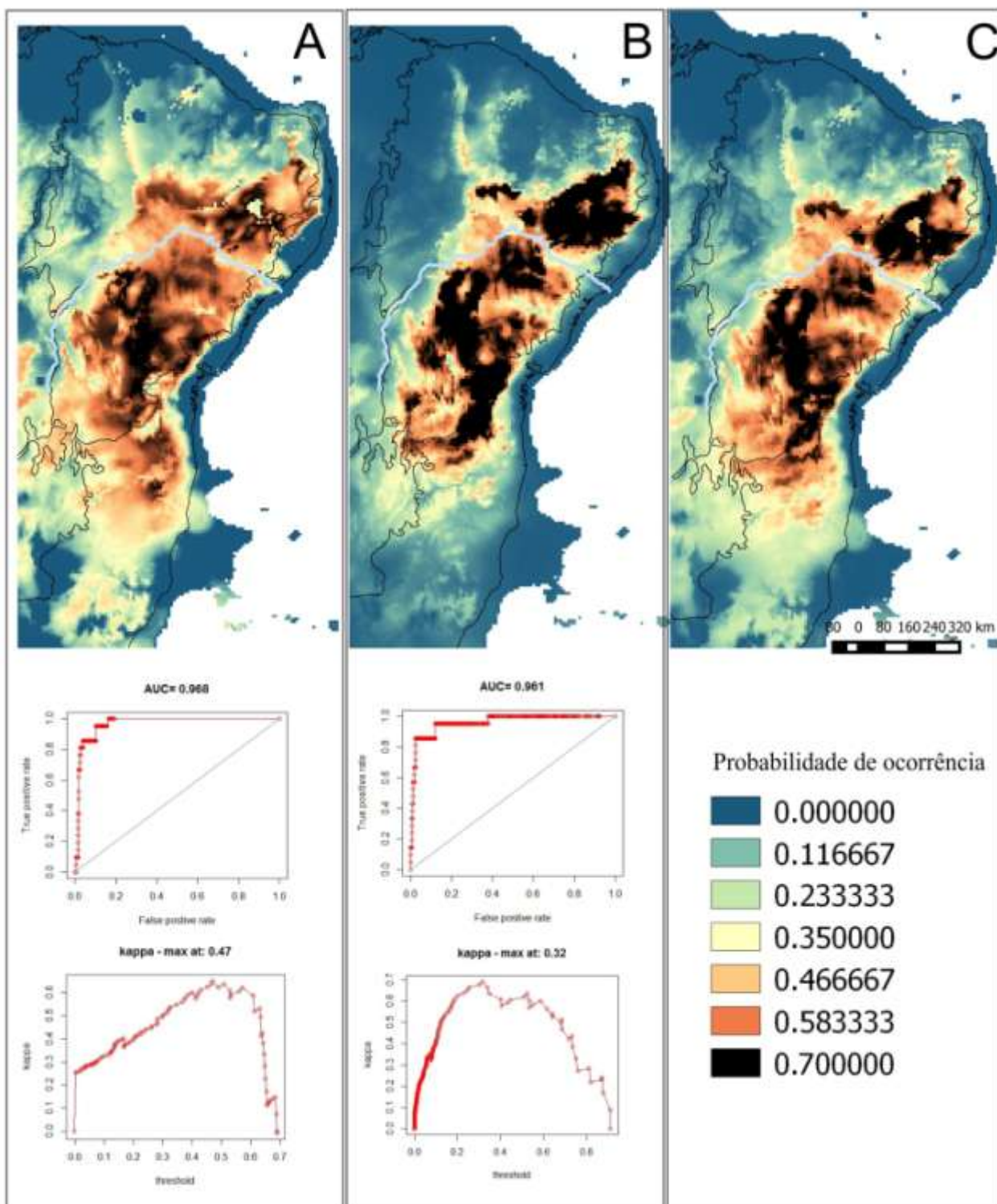
Apêndice 4.6 - *H. ramageana* - ME - Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



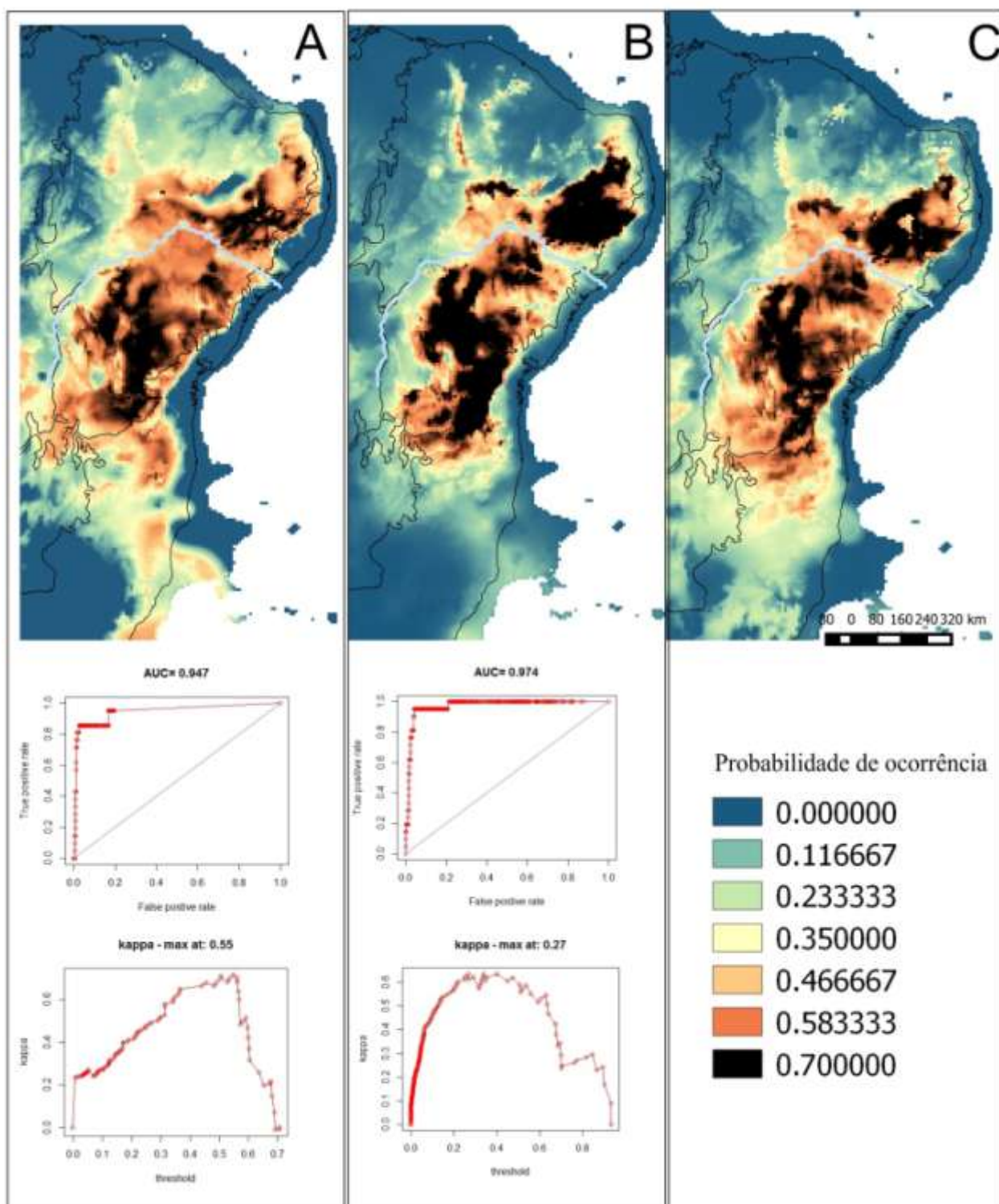
Apêndice 4.7 - *H. ramageana* - MR - Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



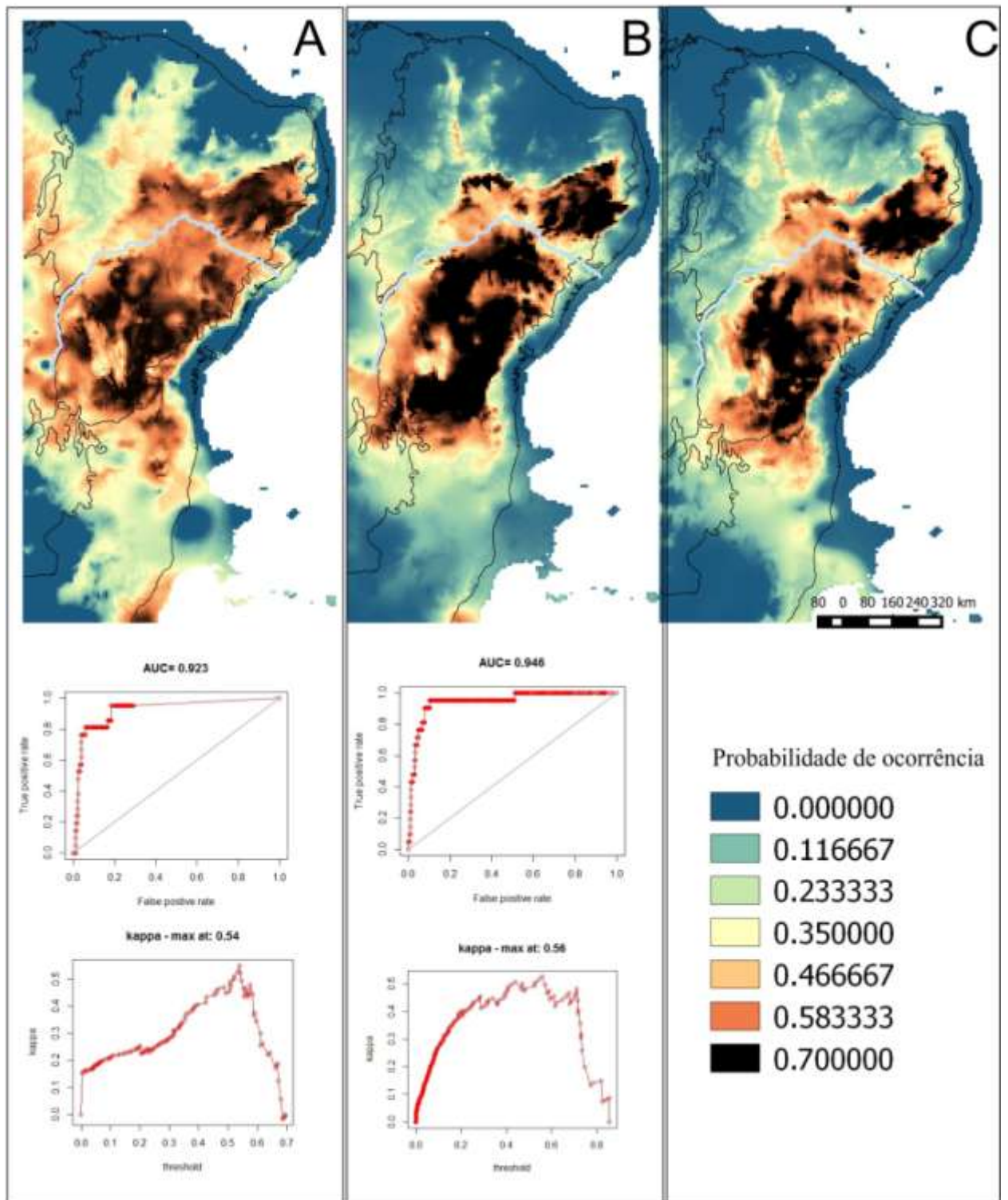
Apêndice 4.8 - *H. catingae* - Interglacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



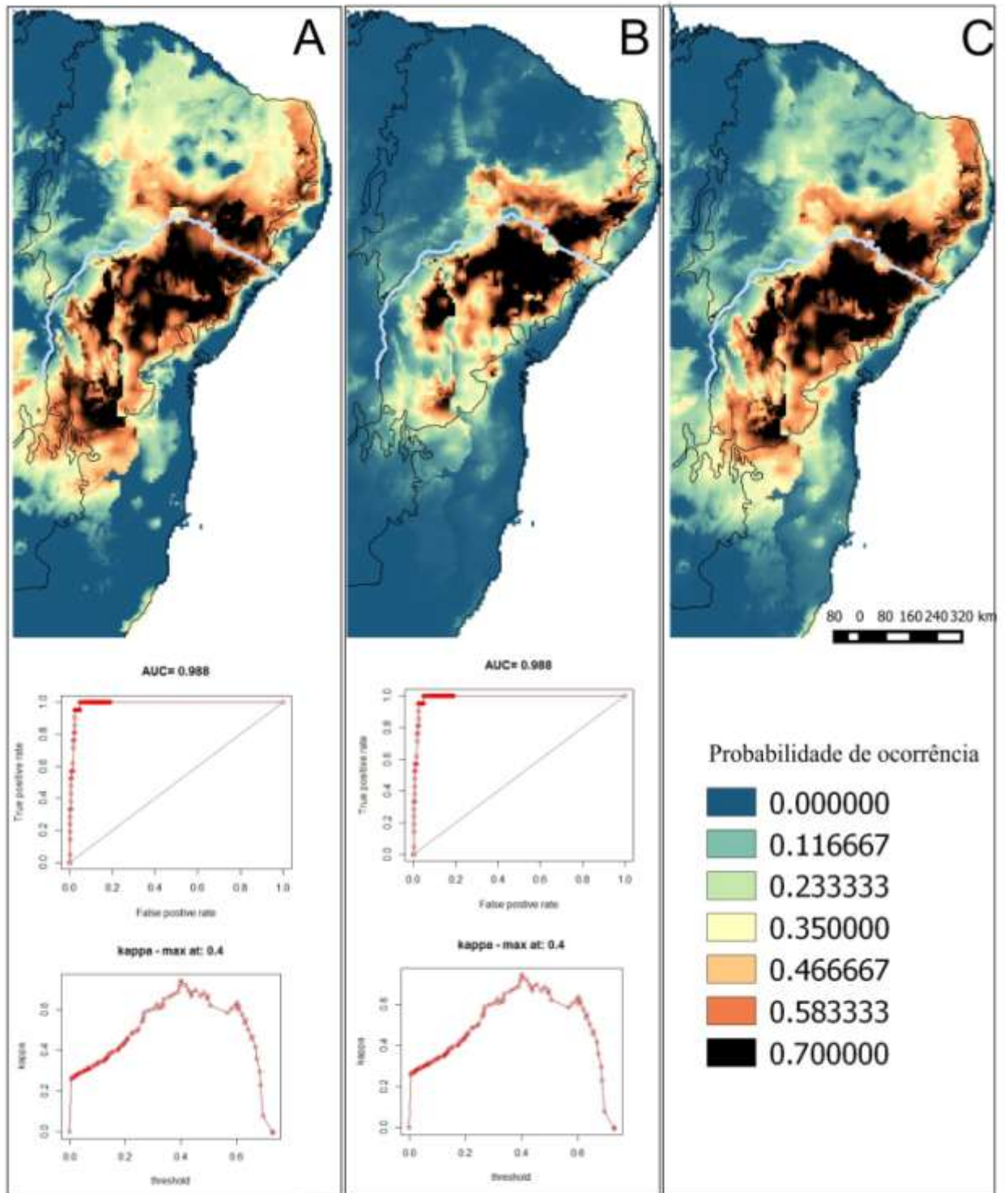
Apêndice 4.9 - *H. catinae* - CC - Ultimo máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



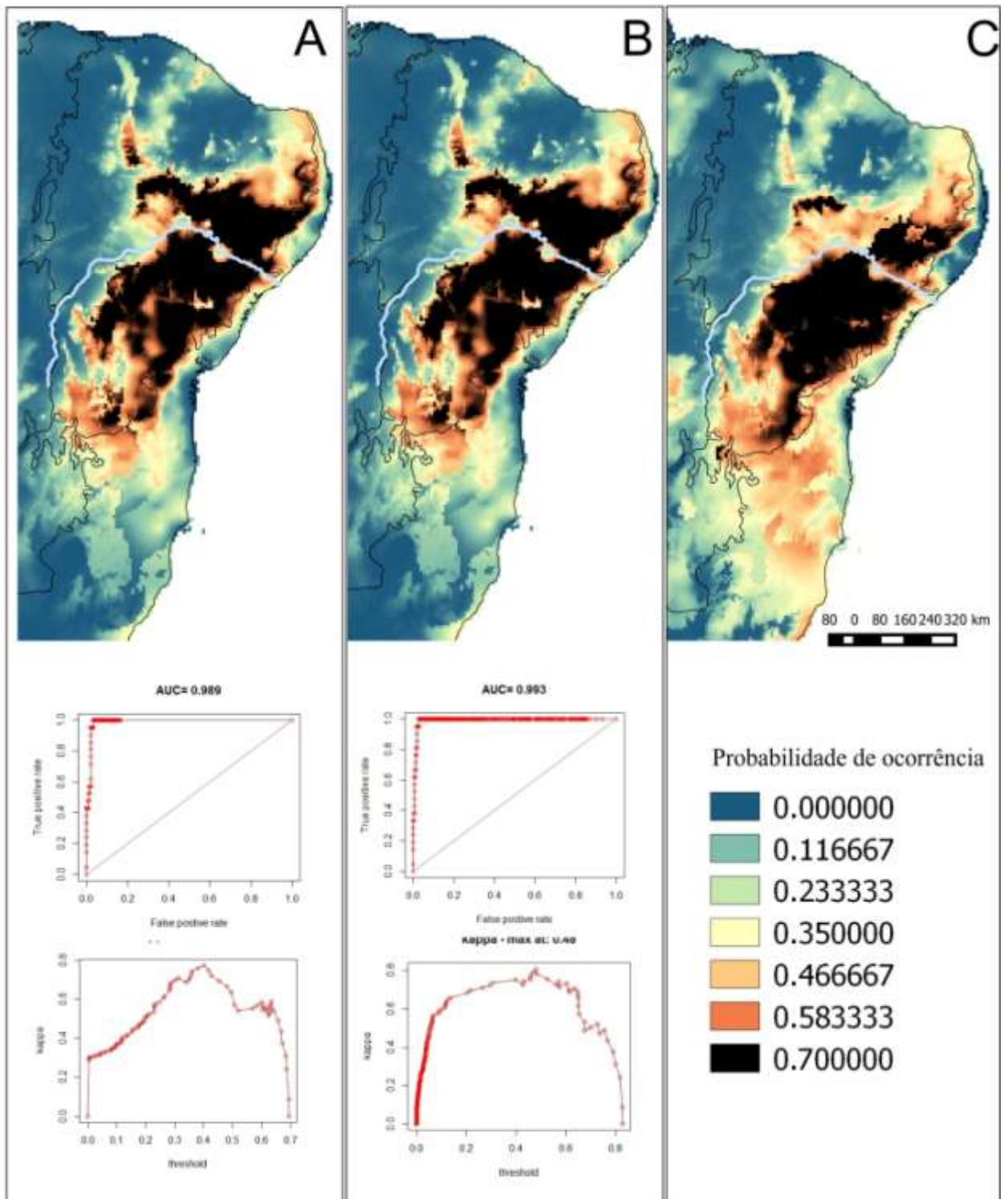
Apêndice 4.10 - *H. catingae* - ME - Último máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



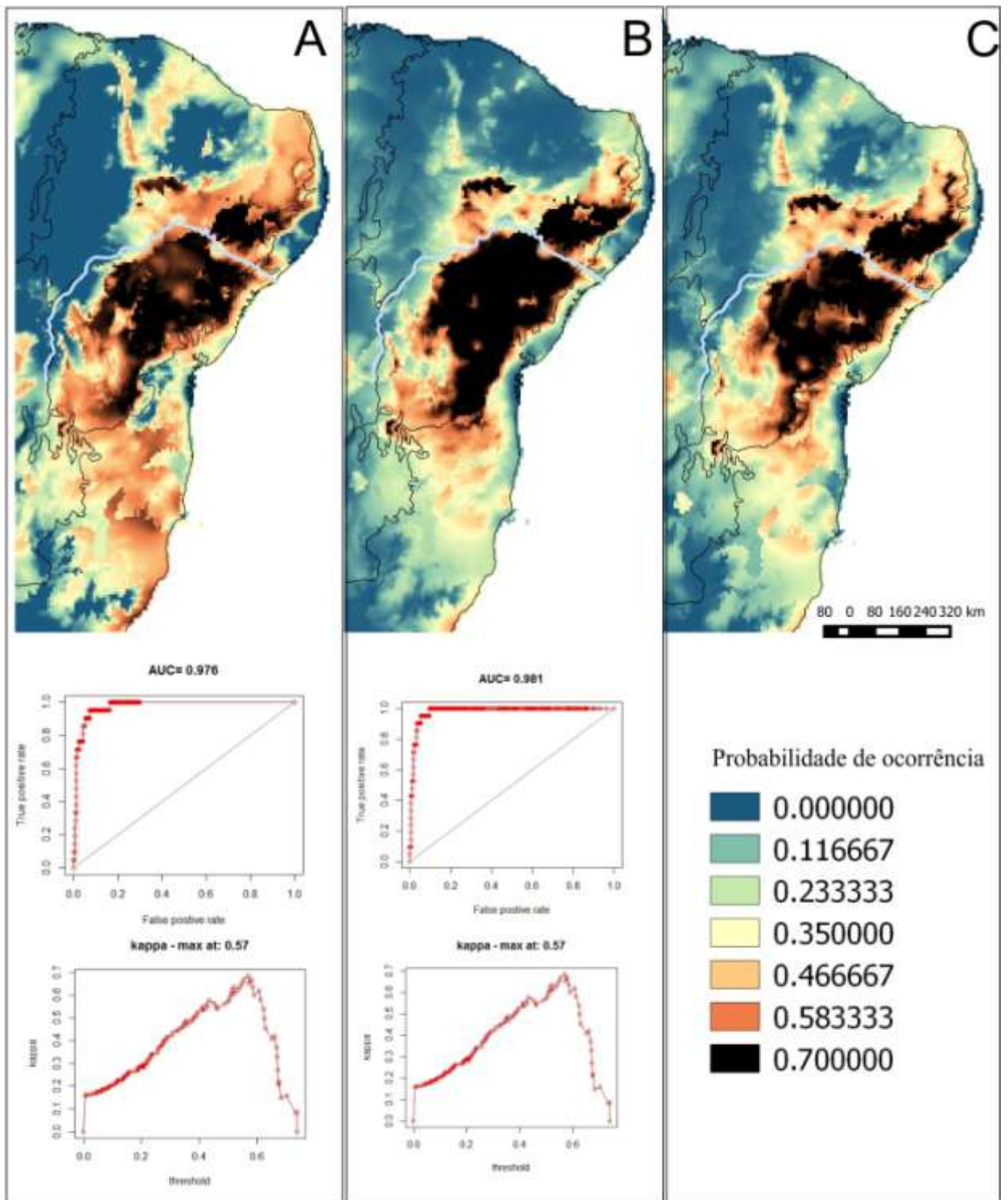
Apêndice 4.11 - *H. catingae* - MR - Ultimo máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



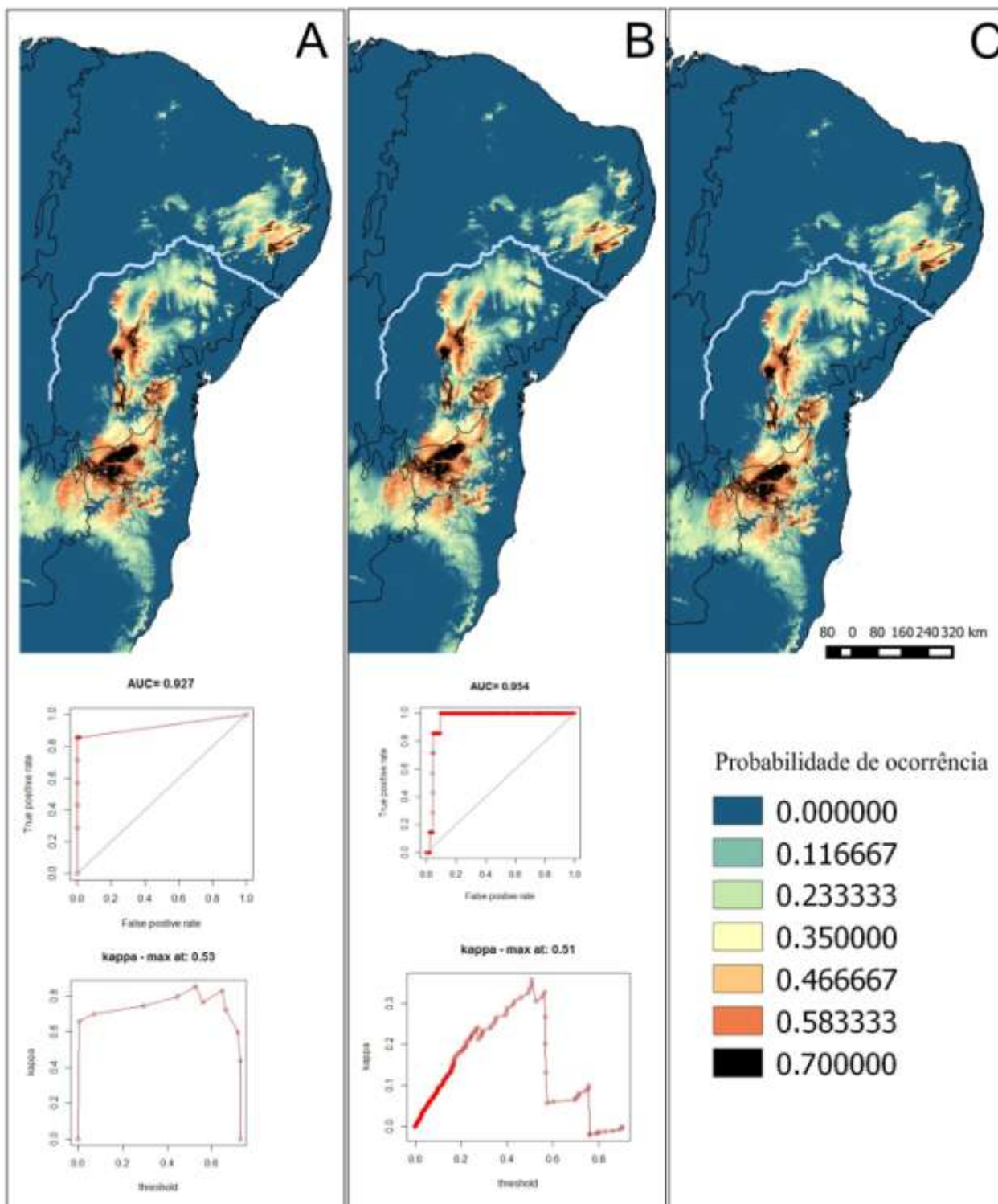
Apêndice 4.12 - *H. catingae* - CC- Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



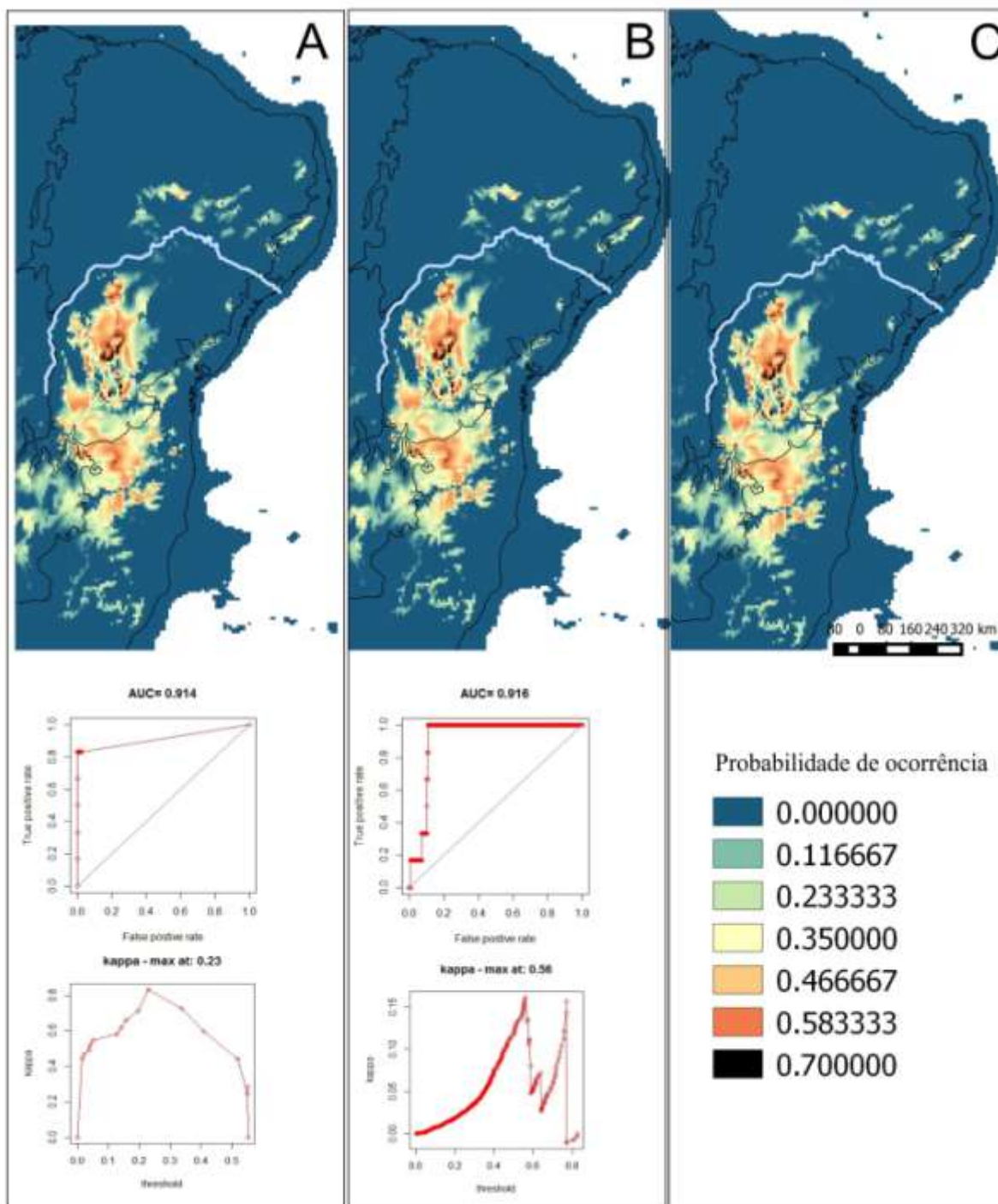
Apêndice 4.13 - *H. catingae* - ME- Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



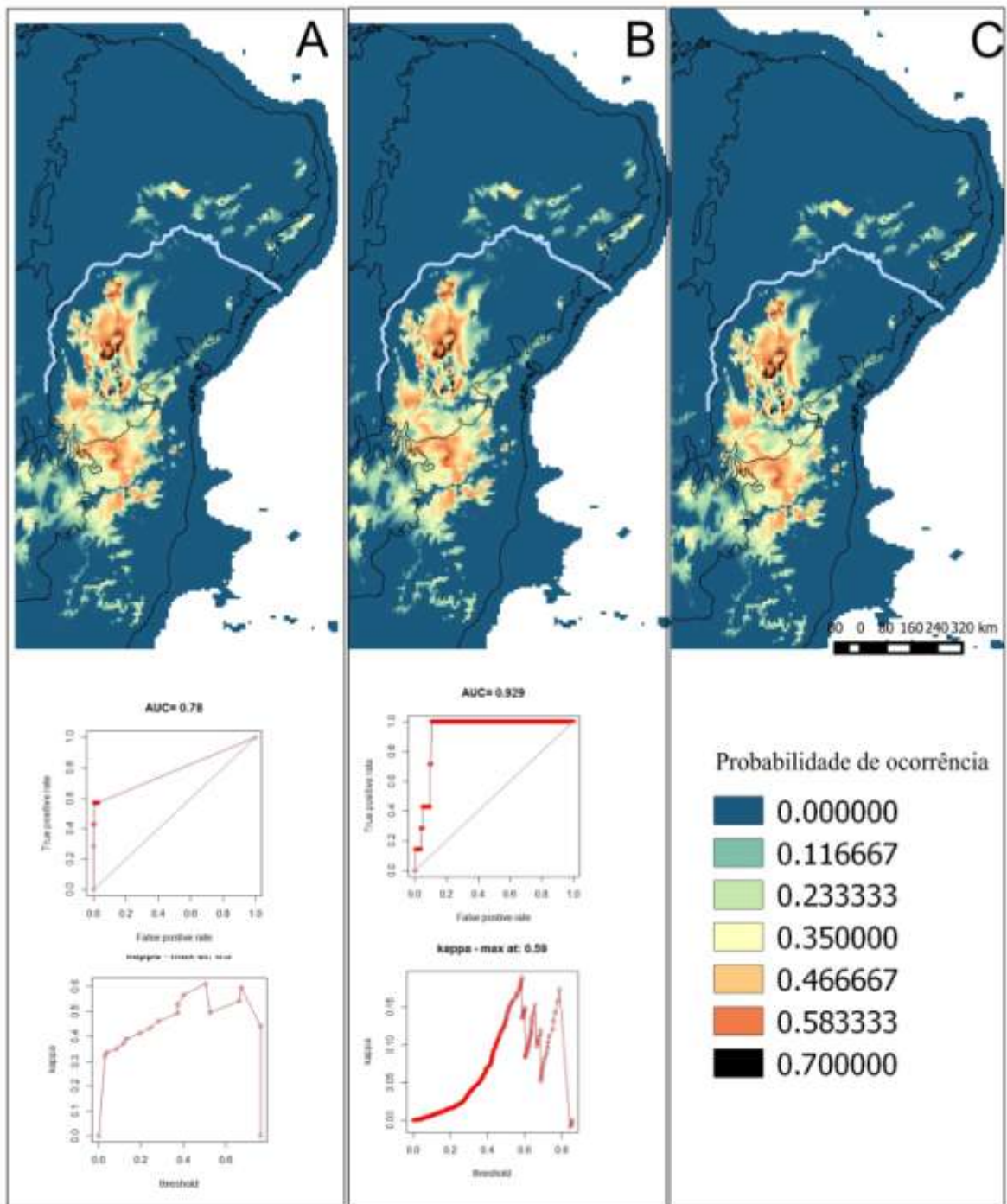
Apêndice 4.14 - *H. catingae* - MR- Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



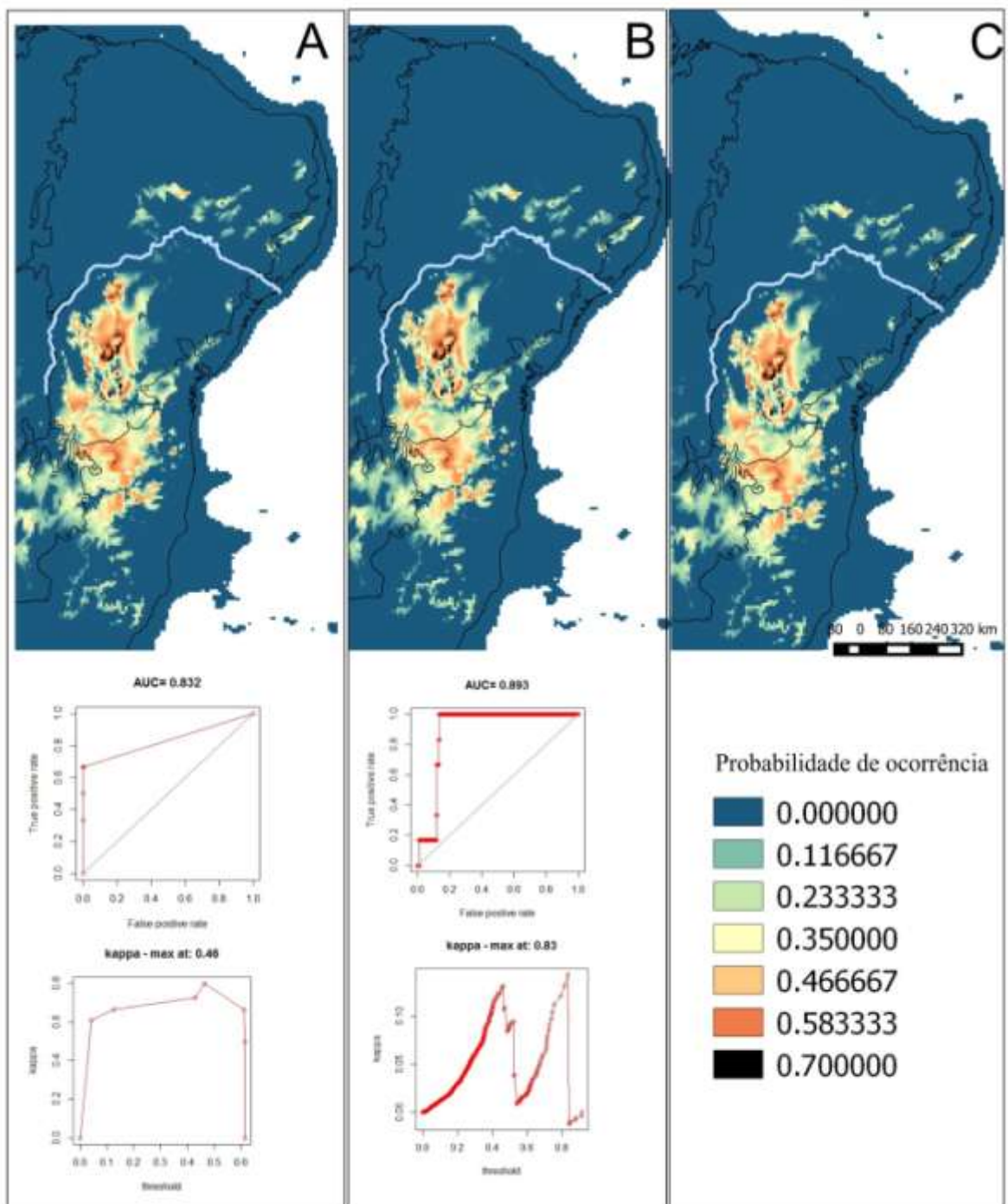
Apêndice 4.15 - Chapada Diamantina - Interglacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



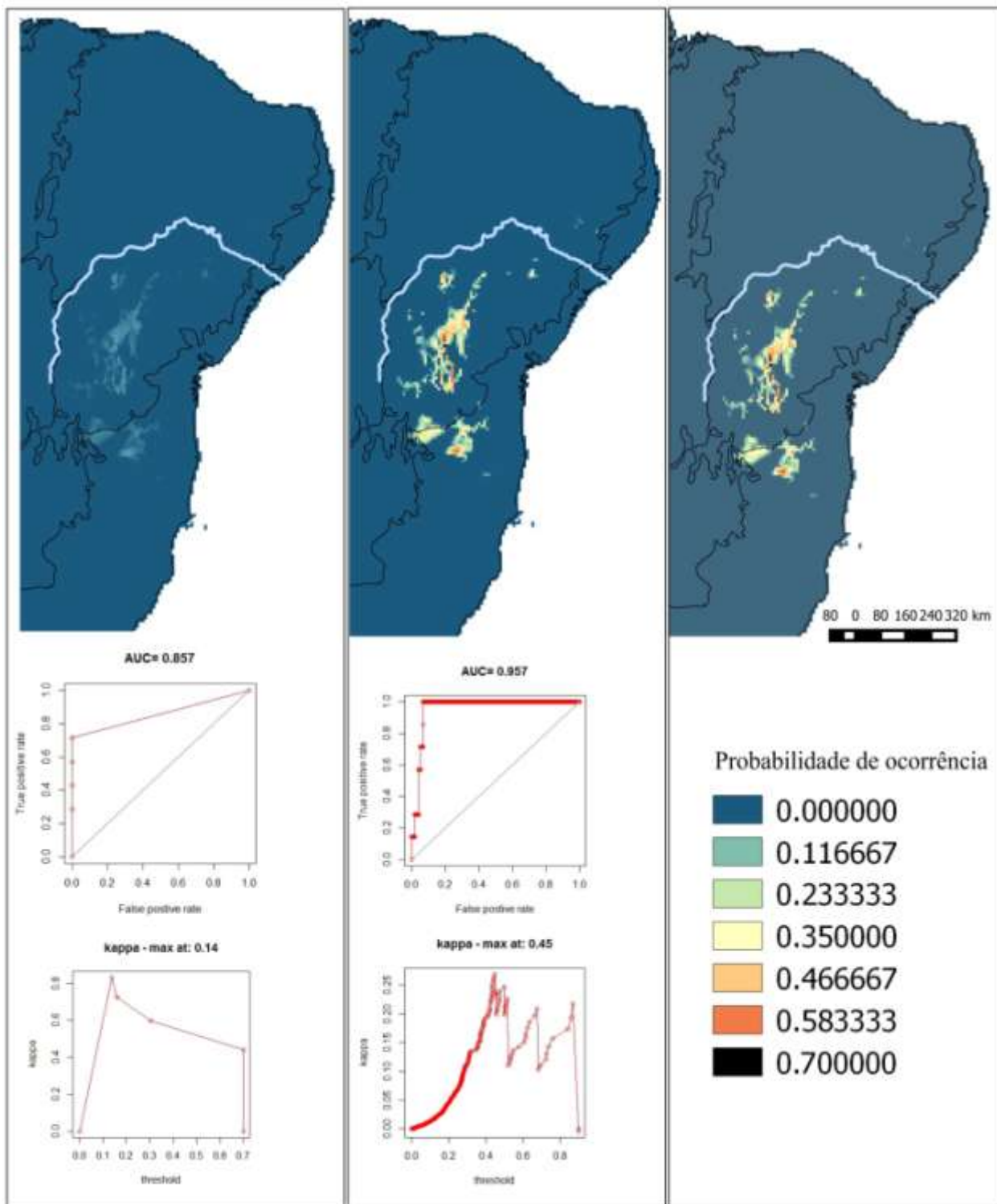
Apêndice 4.16 - Chapada Diamantina -CC - Ultimo máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



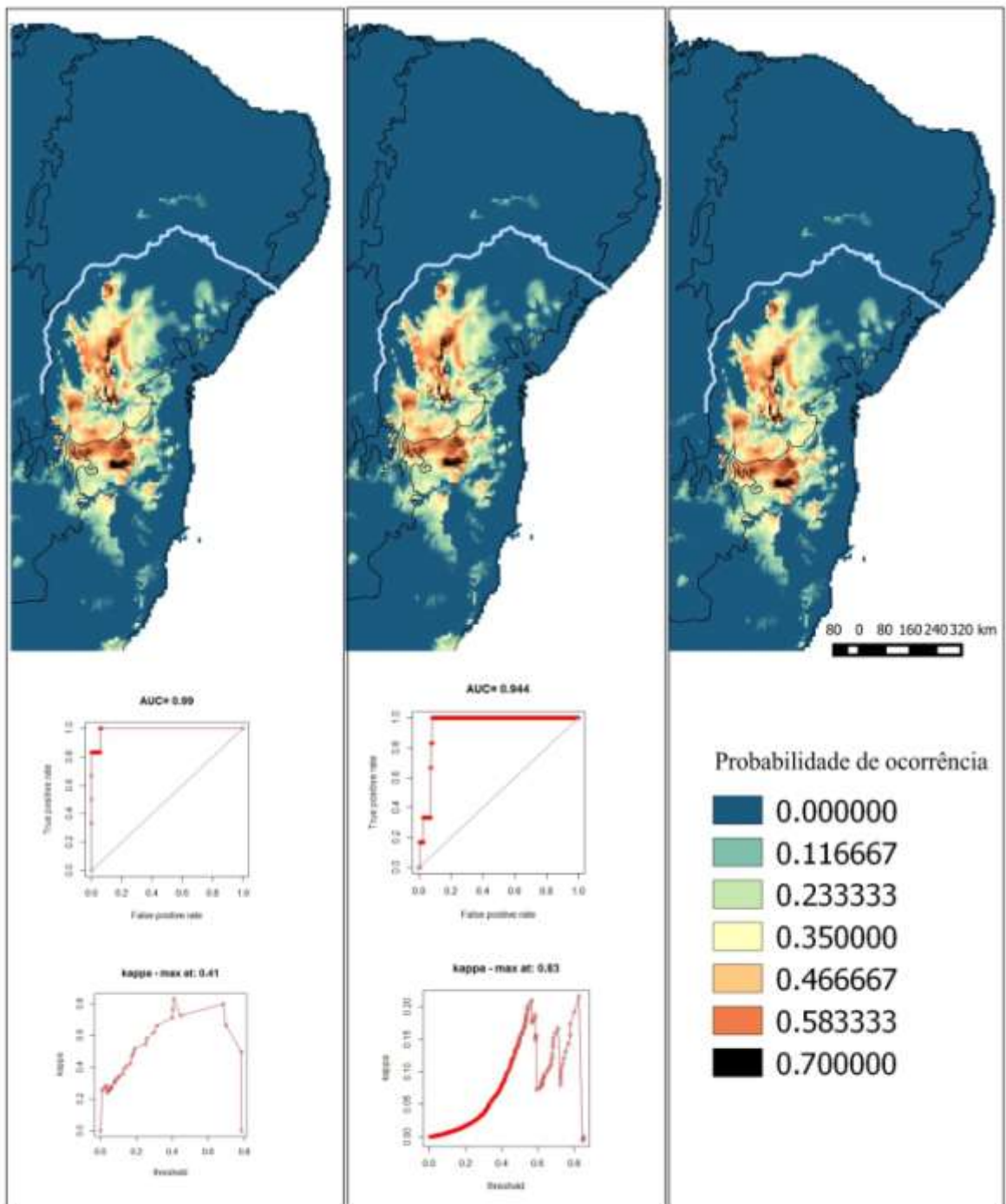
Apêndice 4.17 - Chapada Diamantina - ME - Ultimo máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



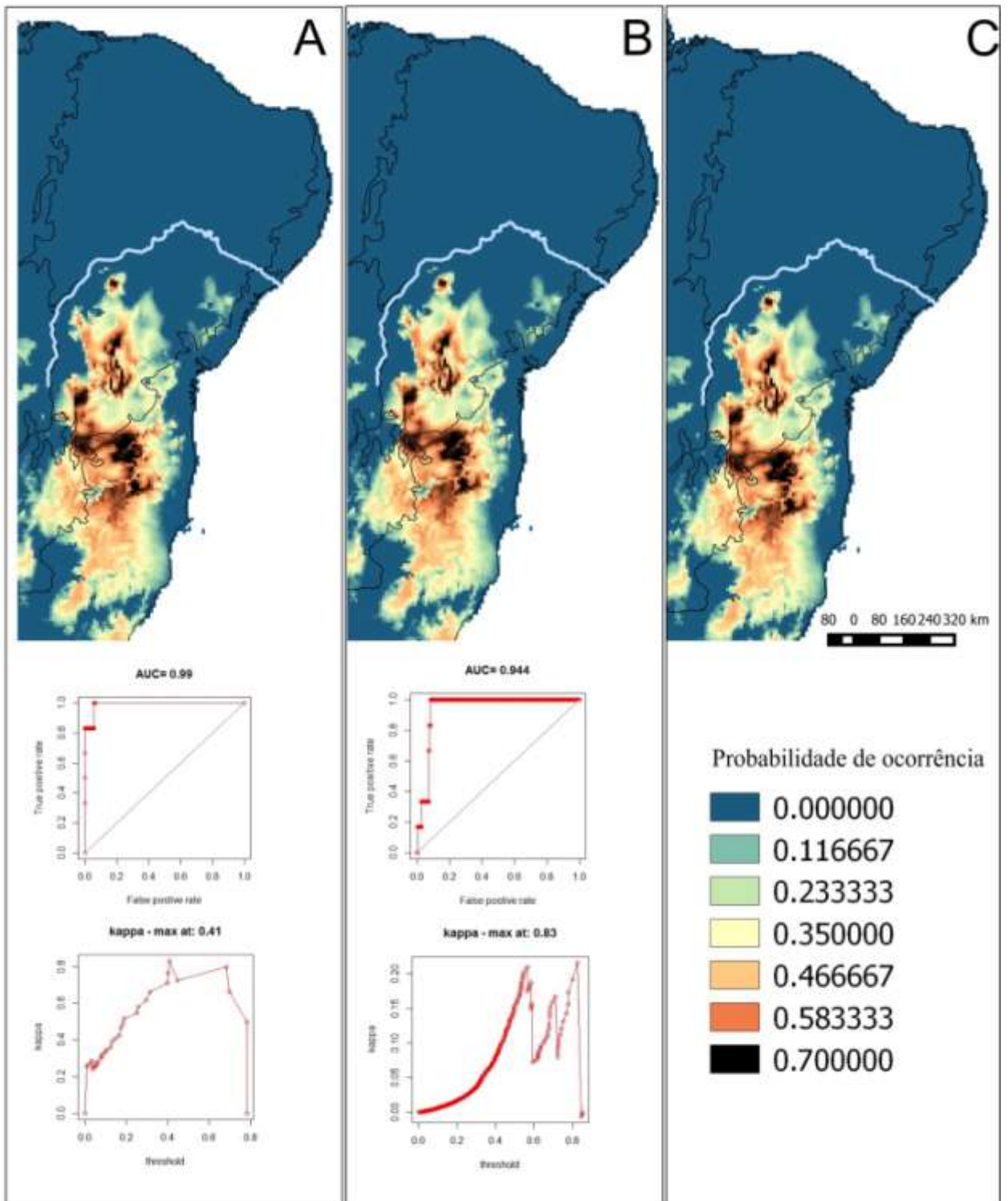
Apêndice 4.18 - Chapada Diamantina - MR - Ultimo máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



Apêndice 4.19 - Chapada Diamantina - CC - Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



Apêndice 4.20 - Chapada Diamantina - ME - Ultimo máximo glacial - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain



Apêndice 4.21 - Chapada Diamantina - MR - Holoceno - A - Domain B - Maxent C - Média Maxent x Domain

CAPÍTULO 5 – A new species of *Hohenbergia* (Bromeliaceae) from the Atlantic Forest in Pernambuco State, Brazil.

Rodrigo César Gonçalves-Oliveira & Maria das Graças Lapa Wanderley.

Manuscrito de artigo científico submetido à revista **Phytotaxa**.

A new species of *Hohenbergia* (Bromeliaceae) from Northeast Brazil.

RODRIGO CÉSAR GONÇALVES-OLIVEIRA^{1-2,*} & MARIA DAS GRAÇAS LAPA WANDERLEY³.

¹*Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Dept. de Genética, CCB, UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CDU, 50.670 – 420, Recife, Brazil.*

**e-mail: rod.biogen@gmail.com*

²*Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, CCB, UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CDU, 50.670 – 420 Recife, PE, Brazil.*

³*Herbário SP, Instituto de Botânica de São Paulo, Jardim Botânico de São Paulo, Av. Miguel Stéfano, 3687, Água Funda, 04301-902, São Paulo, Brazil.*

Abstract: *Hohenbergia isepponae* (Bromeliaceae), a new species from the Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil is described and illustrated herewith. We assessed the conservation status of the new species and compared morphologically related species.

Resumo: Aqui é apresentada a descrição de *H. isepponae* (Bromeliaceae), uma nova espécie da Floresta Atlântica de Pernambuco, Brasil. Definimos um status de conservação e apresentamos ilustração e comparações com espécies relacionadas.

Key words: Brejos de altitude, Bromelioideae, Flora Neotropica.

Introduction

The genus *Hohenbergia* comprises about 66 species, of which 46 occur exclusively in Brazil. Most of these species are endemic to the Northeastern Brazil, mainly in Bahia State. It is a neotropical genus morphologically and phylogenetically closely related to *Aechmea* (Smith & Downs, 1979, Schulte *et al.*, 2009), which shows similarities in several aspects, such as morphology, habit and ecological features. Due to differences in their within-genus morphology, two subgenera are recognized, *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* and *Hohenbergia* subg. *Wittmackiopsis*. These groups are distributed in a disjunction between Eastern Brazil and the Caribbean region (including Venezuela and Colombia) respectively,

where only *H. stellata* Schult & Schult.f. occurs with a wider distribution between these two areas (Mez, 1896, Smith & Read, 1976, Smith & Downs, 1979). The taxonomy of the genus is quite unclear which leads to mistaken identifications of species and places them into other genera such as *Hohenbergia*, as it happened in the case of *H. capitata* Schult. & Schult. f. (Leme, 2010). One of the most difficult complexes are between the species *H. ridleyi* Baker (Mez) and *H. ramageana* Mez, where the artificial key and descriptions provided by Smith & Downs (1979) led to misidentifications once the characters are too similar (Leme & Siqueira-Filho, 2006). Additionally, the variations on the morphology of populations are unknown due no good herbarium collections in number and quality of material (Leme & Siqueira-Filho, 2006). *Hohenbergia* is defined by having their inflorescence of strobilate spikes, in generally ample three-branched inflorescence and petal bearing two appendages (Smith & Downs, 1979).

After the treatment of Flora Neotropica (Smith & Downs, 1979) many new Brazilian species of the genus *Hohenbergia* have currently been described (Leme, 2010a, Leme *et al.* 2010, Maciel & Louzada 2014). Nevertheless, the diversity and taxonomy of the Brazilian species of this genus are poorly understood. The genus presents a difficult taxonomy, considering the usual morphological variation of the field populations and the unclear delimitation of some species. In order to clarify the taxonomy of *Hohenbergia*, further reliable Herbarium collections are needed.

During expeditions to the Atlantic Forest in the State of Pernambuco one different population of *Hohenbergia* was discovered and recognized as a new species, which is described here.

Taxonomy

Hohenbergia isepponae R.Oliveira & Wand., *sp. nov.* (Fig. 1)

Type:—Brazil. Pernambuco: Vicência, Serra do Jundiá, reminiscent of Atlantic Forest on the top of the hill, 7° 37' 19,11" S, 35° 19' 41,58" W, elev. 700 m s.m, 21 February 2014, *Rodrigo Oliveira 50 & Mendes-Silva, H. M.* Holotype SP!.

Hohenbergia isepponae is closely related to *H. ramageana* (Baker) Mez. However, it differs in the morphology of the strongly imbricate ellipsoid spike and oval to orbicular mucronulate floral bracts.

Epiphyte flowering ca. 1.50 m tall, short caulescent. **Leaves** numerous, coriaceous, densely arranged forming a funnellform rosette, abaxially lepidote. Sheaths broadly elliptic, greenish, dark castaneous at the base, margins entire, 11cm long, 7 cm wide. Blades green, ligulate–lanceolate, large, ca. 1,2 m long, 10 cm wide, attenuate toward the apex ending in a stout spine, margins aculeate, aculei antrorse or retrorse, dark-castaneous to nearly black, ca. 2 mm, densely toward the apex. **Peduncle** stout, erect, 1,2 m long, ca. 1 cm wide, densely yellow-gold lanate. Peduncle bracts exceeding the internodes, 6–13 cm long, oval-triangulate and attenuate, brownish, margins ciliate to glabrescent, membranaceous, basal ones imbricate, oval-triangulate and attenuate. **Inflorescence** paniculate, pyramidal, compound, with branches from third to fourth order, yellow goldish to castaneous lanuginous, ca. 70 cm long, 60cm wide at the base, gradually shorter towards the apex, bearing densely short pedunculate to sessile fascicles of ellipsoid or cylindrical spikes. Primary bracts resembling the peduncle bracts, lanuginose, nervate, margins ciliate to glabrescent, 0.5–5.5 cm long, exceeding the internodes, oval- triangular, attenuate. Primary branches patent to spreading, laxly arranged, 10 – 25 cm long. Secondary branches ca. 5 x 0,8 mm, resembling the primary branches. Secondary bracts similar to the primary bracts, triangular lanceolate, acuminate, exceeding the first internodes, margins entire. Tertiary and quaternary branches ca. 2 x 3 cm. Tertiary and quaternary bracts oval, mucronate, green, convex, densely lanuginous. **Spikes** aggregated at the the apices of the branches, ellipsoid to cylindrical, apex rounded, ca. 2 cm long, ca. 10 flowers, with densely imbricate bracts . **Floral bracts** strongly imbricate, shorter than the sepals, 0.4 x 0.1–0.2 cm, oval to orbicular, mucronulate, convex, green. **Flower** ca. 1.7 cm long, sessile, densely arranged. **Sepals** strongly imbricate, short connate, exceeding the floral bracts, asymmetric, unilaterally auriculate, mucronulate, mucro ca. 2 mm long. **Petals** membranaceous, purple, margins and base white, lobes ca. 1 cm long, two petal appendages; **Filament** complanate, ca. 0.8 mm long, the inner free, and the outer epipetalous, anthers oblong, dorsifixed. **Style and stigma** 0.8 mm long, stigma spirally conduplicate. **Ovary** trigonous, placentation axial, ovules affixed at apex of the placenta, caudate, flat, ca. 0.6 × 0.8 cm, striated. Fruit and seeds not seen.

Etmology:—The species *H. isepponae* was named after the Brazilian researcher and geneticist Professor Ana Maria Benko Iseppon from the Universidade Federal de Pernambuco, in

honor of her extensive work to enhance the knowledge about cytogenetic and evolution of Bromeliaceae.

Habitat and distribution:—This species is only known from its type collection, from Vicência – PE, growing in the surrounding of a submontane Atlantic Forest remnant, in an area with an elevation around 700 m as an epiphyte. The area is covered by a tropical submontane climate. Such area is usually humid due to the elevation, orographic rains as well as mild temperatures throughout the whole year.

Conservation Status:—There is lack of knowledge about the distribution of *H. isepponae*. Around the area only one sample flowering was found. In this way one population is registered and few individuals are estimated to exist. Therefore, this species may be treated as CR (Critically endangered according to IUCN, 2001). Although this species was collected in an area protected by law (APP – *Área de Proteção Permanente* - Permanent Protection Area), we observed several anthropogenic disturbances on the environment such as vegetation suppression by farming systems and mainly by banana monoculture in slope areas.

Comments:—*Hohenbergia isepponae* is a species from medium elevation of the Atlantic Forest of Pernambuco, Brazil. This species is closely related to *H. ramageana* Mez and is part from the *H. ramageana* complex. It differs by the morphology of floral bracts oval to orbiculate × subtriangulate and the morphology of the spikes cylindrical and dense on the basis × sparse on the base, dense on the apex. The new species is also related to *H. ridleyi* (Baker) Mez., but it can be easily differentiated by the morphology of the spike (ellipsoid with rounded apex × ovoid with acute apex), ramification of the inflorescences (branches at fourth order × branches of third order) and floral bracts (oval to orbicular and mucronulate apex × ovate and attenuate apex). *H. isepponae* presents spikes with shorter internodes, bracts densely arranged and a rounded apex, which are a diagnostic characteristic of this new species. In *H. ridleyi* the ovate attenuate floral bracts are much less imbricate. This species clearly belongs to the *H. ridleyi* species complex together with *H. ramageana* and *H. blanchetii*. The three species shares a bench of morphological characters that overlaps onto each other in natural populations. Once the floral pattern (mainly the size of floral bracts and pollen morphology) is the main character used to

spread *H. ramageana* and *H. ridleyi* in two taxa (Leme & Siqueira-Filho, 2006) we argue that *H. isepponae* shows a unique floral pattern not shared with *H. ridleyi* or *H. ramageana* (Fig. 2).

Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES for the financial support provided by the projects on PNADB and PROBRAL/CAPES/DAAD, as well as FACEPE for granting the doctoral scholarship to first author. We are also thankful to A. Pehmüller and H. Mendes-Silva for their support, as well as Klei Sousa for providing the botanical illustration.

References

- Forzza, R.C., Costa, A., Siqueira-Filho, J.A., Martinelli, G., Monteiro, R.F., Santos-Silva, F., Saraiva, D.P., Paixão-Souza, B., Louzada, R.B. & Versieux, L.M. (cont. upd.) Bromeliaceae In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available from: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br> (accessed: 27 January 2015).
- IUCN (2010) *The IUCN red list of threatened species*, version 2010.4. IUCN Red List Unit, Cambridge U.K. Available from: <http://www.iucnredlist.org/> (accessed: 12/11/2015).
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.45189>
- Leme, E.M.C. (2010) Re-establishing *Hohenbergia capitata*. *Journal of the Bromeliad Society*, 60: 151–157.
- Leme, E.M.C. (2010a) Miscellaneous new species of Brazilian Bromeliaceae. *Selbyana* 30(2): 129–146.
<http://www.jstor.org/stable/41759989>
- Leme, E.M.C., Fraga, C.N., Kollmann, J.C., Brown, G.K., Till, W. Ribeiro, O.B.C., Machado, M.C., Monteiro, F.J.S. & Fontana, A.P. (2010) Miscellaneous New Species in the Brazilian Bromeliaceae. *Rodriguésia* 61: 21–67.
- Leme & Siqueira-Filho (2006). Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas In: Siqueira-Filho & Leme. Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste, Biodiversidade, Conservação e suas Bromélias. Andrea Jakobson.

- Maciel, J.R. & Louzada, R. (2014). A new species of *Hohenbergia* (Bromeliaceae) from Bahia, Brazil. *Phytotaxa* 156(1), 54–58.
<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.156.1.4>
- Mez, C. 1896. Bromeliaceae. In: de Candolle, A.P.P & de Candolle, A.C.P. (Eds.), *Monographiae phanerogamarum*. Paris, vol.9, pp. 1–990.
- Schulte, K., Horres, R., & Zizka, G. (2005). Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family. *Senckenbergiana biologica*, 85, 113-125.
- Smith, L.B. & Downs, R.J. (1979) Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1493–2142
- Smith, L.B., Read, R.W. (1976) Notes on Bromeliaceae: 38. *Phytologia* 33(7): 429–443.

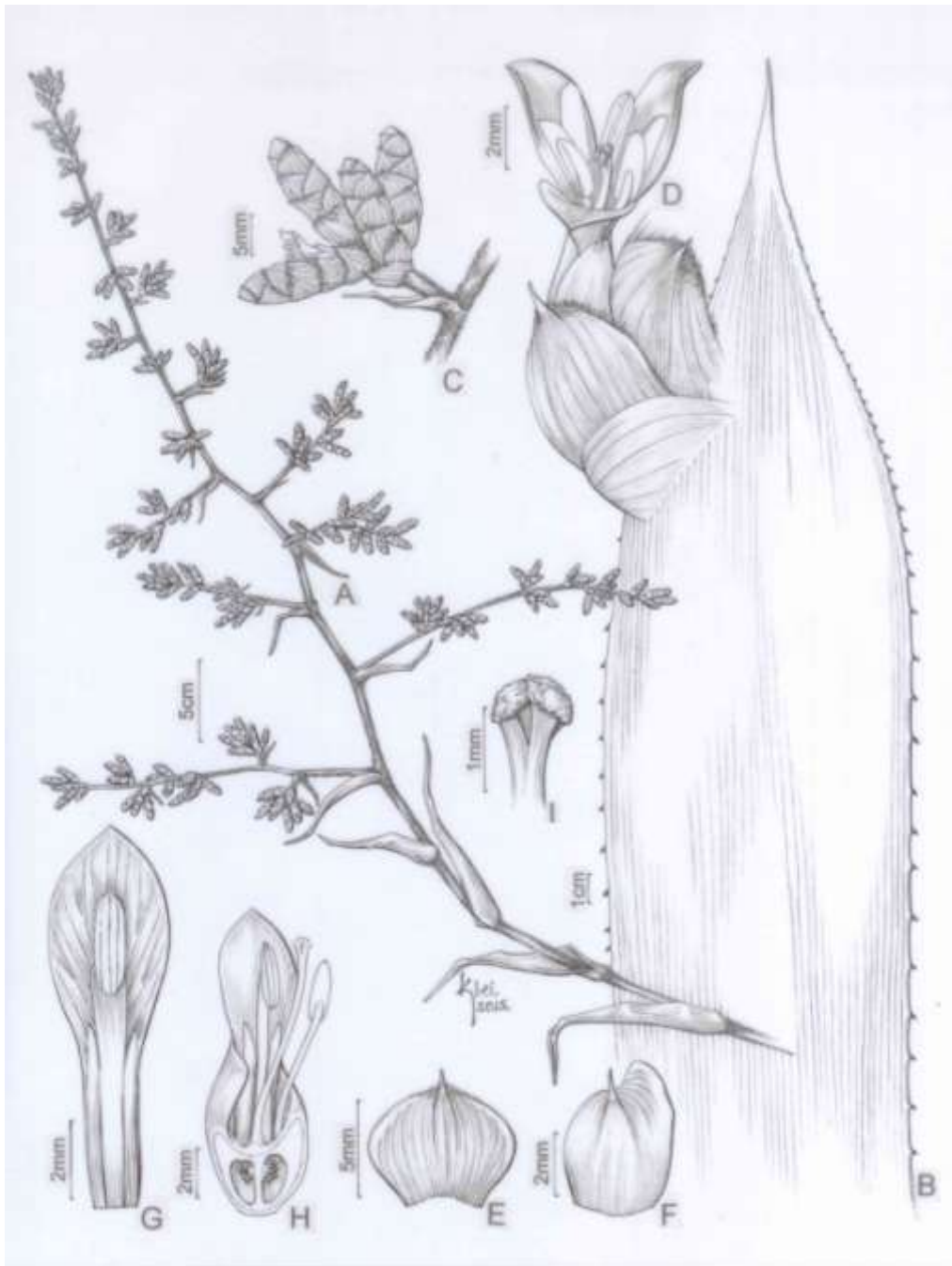


FIGURE 1. A – I *H. isepponae* (Rodrigo Oliveira 50 & Mendes-Silva). A. Inflorescence showing the lateral branches with the spikes, B. Leaf blade showing the apical spine, C. Detail of the inflorescence, D. Flower and floral bract, E. Floral bract, showing the apex mucronate, F. Asymmetric sepal showing the apex mucronate, G. Petal with adnate stamen, H. Flower in longitudinal section, showing the ovules in the apex of ovary, I. Stigma. (Illustration by Klei Sousa).

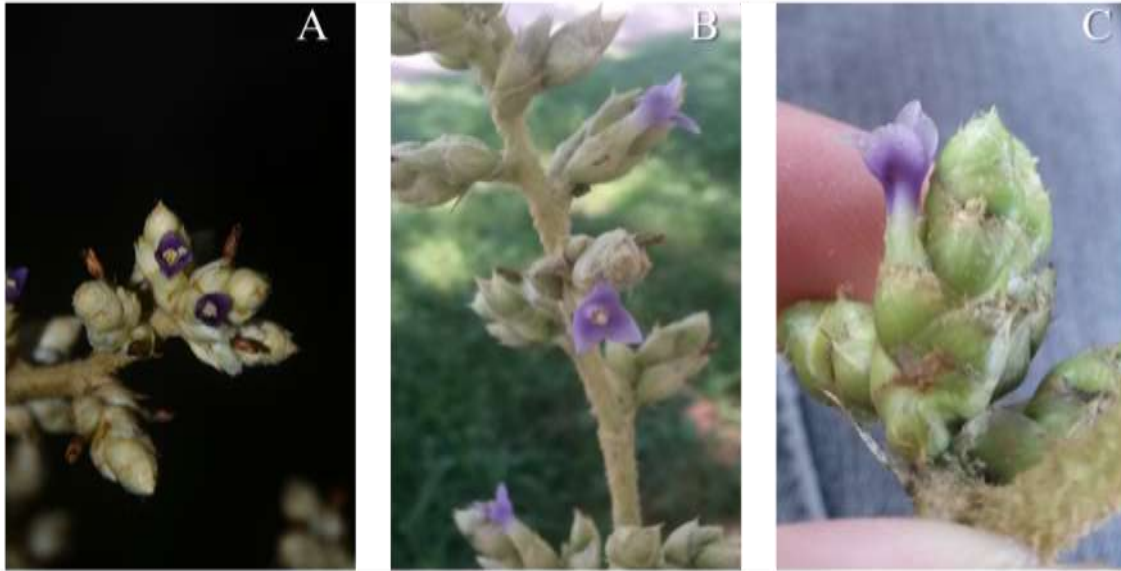


FIGURE 2 – Detail of the inflorescence on the *Hohenbergia ramageana* complex. A – *H. ramageana* (Photo. Maciel). B – *Hohenbergia ridleyi*. C – *H. isepponae*.

CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados formam um conjunto único e representam os resultados de quatro anos de coletas e análises com membros de Bromeliaceae da Floresta Atlântica, Caatinga e Campos rupestres. Os resultados obtidos adicionam conhecimentos novos acerca da evolução, distribuição, ecologia, origem e taxonomia do grupo nesses ecossistemas. Pontualmente observamos características evolutivas diferenciadas entre membros de *Encholirium*, de ambientes xéricos, comparativamente a táxons de *Hohenbergia* com origem na Floresta Tropical.

Para *Encholirium* observamos o primeiro registro de especiação críptica em ambientes de afloramentos rochosos na Caatinga. As populações da região de Sergipe apresentaram-se como uma linhagem diferenciada das demais populações estudadas. Esta região aparenta compreender um ecossistema diferenciado, funcionando como uma barreira ecológica, fato corroborado inclusive pelos modelos obtidos para *Hohenbergia*, que não apresentam boas probabilidades de ocorrência do gênero na região.

A diversidade morfológica observada em *E. spectabile* é congruente com os resultados genéticos, sugerindo que se trata de uma espécie com altos valores de heterozigosidade em suas populações.

Os resultados mostram ainda que a polinização apresenta um papel preponderante na manutenção da diversidade genética em *Encholirium*. Comprovamos que a dispersão de sementes é menos efetiva que a polinização e apresenta-se limitada mesmo em ambientes mais adequados como os campos rupestres. Ficou claro ainda que para o gênero *Encholirium* a estruturação genética populacional sugere que nos campos rupestres as populações apresentam muito mais fluxo gênico que em *inselbergs* isolados da Caatinga.

O gênero *Hohenbergia*, por sua vez, possui maior diversidade na Floresta Atlântica, seu ecossistema de origem. Parece compreender um grupo de evolução recente e rápida, conforme indica a restrita diversidade molecular e o baixo sinal filogenético em genes normalmente utilizados para a filogenia de Bromeliaceae. Além disso, apresenta taxonomia bastante confusa, especialmente nos complexos específicos *H. ramageana* e *H. catinae*. Para o complexo *H. ramageana* descrevemos um novo táxon, fundamentados na morfologia diferenciada de uma população encontrada no Estado de Pernambuco.

Observamos ainda evidências de que as espécies *H. littoralis* e *H. castellanosii* provavelmente fazem parte de outro gênero, pois não agruparam dentro do clado que incluiu todas as outras

Hohenbergia. O subgênero *Wittmackiopsis*, de distribuição na região caribenha, deve compor outro subgênero, como já proposto em outros estudos.

Os resultados aqui apresentados sugerem que o posicionamento geográfico e o ecossistema em que as espécies ou populações ocorrem apresentam um papel isolador sugerindo que a evolução por isolamento ecológico deve ocorrer com frequência em Bromeliaceae. Efeitos de isolamento por redução ou expansão da distribuição no período pleistocênico também apresentam influência em grupos de evolução rápida e recente como em *Hohenbergia*.

Por fim, observamos que a região leste brasileira compreende a uma importante província biogeográfica para Bromeliaceae.

ANEXO 1 – Composições fotográficas das características citogenéticas de *Hohenbergia* compilados por Amanda Ximenes.

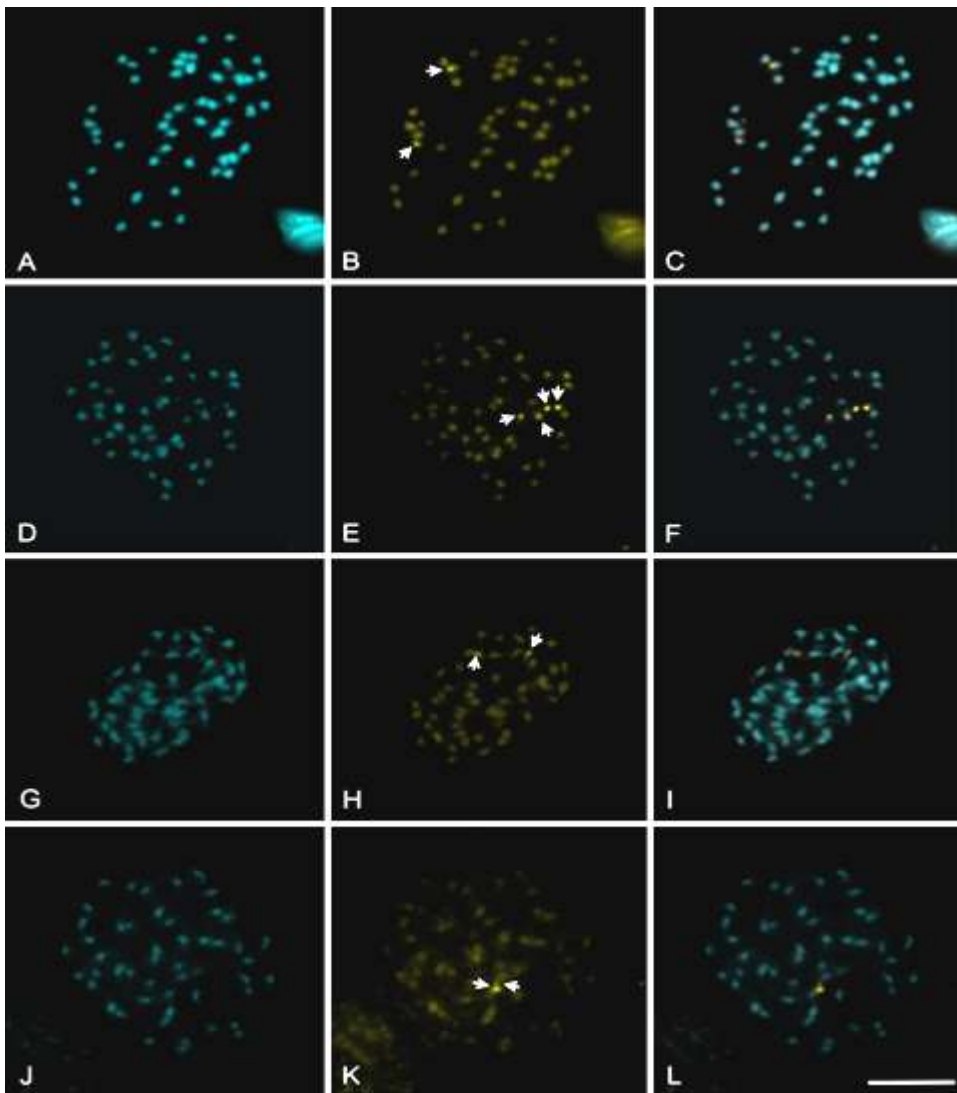


Figura 1. Metáfases mitóticas de *Hohenbergia*: (A, B, C) *H. igatuensis*; (D, E, F) *H. castellanosii*; (G, H, I) *H. conquistensis*; (J, K, L) *H. vestita*. Na primeira coluna: células coradas com DAPI (azul), segunda coluna: células coradas com CMA (amarelo) e terceira coluna as imagens das células sobrepostas com os dois corantes CMA₃/DAPI.

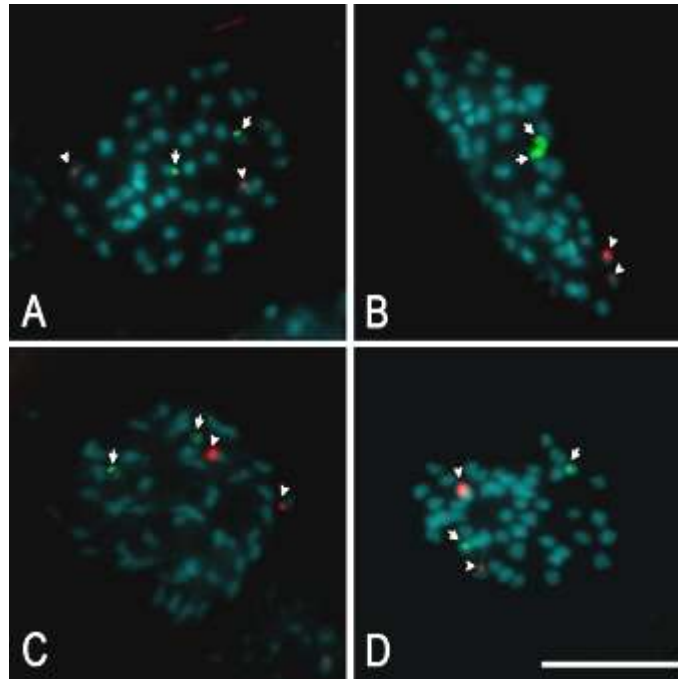


Figura 2. Metáfases mitóticas de *Hohenbergia* hibridizadas *in situ* fluorescente, incluindo: (A) *H. catinae*, (B) *H. conquistensis* (C), *H. utriculosa*, (D) *H. castellanosi*. As setas apontam para as regiões hibridizadas com o DNAr 45S (Verde) e as cabeças de setas indicando regiões hibridizadas com o DNAr 5S (Vermelho).

ANEXO 2 – Resumos apresentados em congressos

1. Resumo apresentado no I Bromevo – Porto de Galinhas – PE - 2015

Nuclear and chloroplast microsatellite data reveal unexpected patterns on *Encholirium spectabile* population genetic structure

Rodrigo César Gonçalves-Oliveira^{1,2,3}, Tina Wöhrmann³, Florian Krapp³, Kurt Weising³, Marccus Alves⁴ and Ana Maria Benko-Iseppon^{1,2}.

1 – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Recife, Brazil.

2 – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, Brazil.

3 – Universität Kassel, Wissenschaft Abteilung, Institut für Biologie, Pflanzen Molekular und Systematik Labor, Kassel, Germany.

4 – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Laboratório de Morfo-taxonomia Vegetal, Recife, Brazil.

Brazilian dry forest Caatinga occupies most of the northeastern region that is portrayed by its extreme environmental conditions, showing a distinct flora composition as a result of influences from soil, altitude and climatic factors. In this region *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) presents striking morphological variation, mainly concerning populations from the northern portion of the ‘Espinhaço’ range that include individuals with short pedicels, differing from the long pedicel observed in specimens found mostly on the Caatinga depression, Borborema plateau and Raso da Catarina. The species is almost exclusively found in rocky outcrops and less frequently to shallow and rocky soils, conferring an island-like geographic distribution. In order to access the population genetic structure of *E. spectabile* eight nuclear and four chloroplast microsatellite markers were applied on 240 individuals collected from 21 Caatinga populations. The results were analyzed using statistic programs STRUCTURE, ARLEQUIN, HAPLOTYPE, GENEPOP and FSTAT. In general terms, populations presented patterns in accordance to other bromeliads from rocky outcrops (F_{st} nuclear = 0.3604; F_{st}

chloroplast = 0.9055). No correlation between genetic and geographic distances was recognized. For the genetic nuclear data, the Bayesian clustering by STRUCTURE revealed two groups (K=2), clustering populations from western Caatinga and Borborema plateau together and isolating them from the central-eastern limit of Raso da Catarina, contrasting to the expectations considering morphological features. Similar patterns were also observed for chloroplast data, where shared haplotypes occurred between northern and southern populations whereas central-eastern populations presented private haplotypes. Limited gene flow between these regions was also predicted ($N_e m \sim 0.1182$). The differentiation between these two areas was clear when population pairwise F_{st} values were compared, since values between these two groups were higher. It was also possible to compare chloroplast and nuclear genetic structure, revealed by AMOVA, uncovering a more efficient nuclear gene flow (5.1 times) than chloroplast, suggesting that pollination plays a main role on gene flow. The dissimilarities between clusters were not expected for this species, once the most important morphological differentiation is between north and south. Since this species presents other variable morphological features, the circumscription of subgroups within this species remains difficult. In this case environmental factors seem to be responsible for the speciation in course, whereas the observed genetic structure suggests that these two groups regard cryptic species.

Acknowledgments: CAPES/DAAD/PROBRAL, FACEPE, CNPq.

2. Resumo apresentado no I Bromevo – Porto de Galinhas – PE - 2015

Population genetic structure of *Hohenbergia ridleyi* give insights about relationships between lowland forests and ‘brejos de altitude’ in Northeastern Brazil.

Hévilá Mendes-Silva^{1,2}; Rodrigo César Gonçalves-Oliveira^{1,3}; Maria das Graças Lapa Wanderley.⁴ Ana Maria Benko-Iseppon^{1,2,3}.

¹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Dept. de Genética, CCB, UFPE, Recife, PE.

²Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, CCB, UFPE, Recife, PE.

³Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, CCB, UFPE, Recife, PE.

⁴Herbário SP, Instituto de Botânica de São Paulo, Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, SP.

hevila.ufpe@gmail.com

Key words: Atlantic Forest, SSR, microsatellite

In Northeast Brazil two main biomes are found, Tropical Atlantic Forest and Seasonal Dry Tropical Forest, the ‘Caatinga’. As part of Atlantic Forest domain, some medium altitude forest are found as enclaves in the middle of ‘Caatinga’ (known as ‘brejos de altitude’), this make them unique environments once their surrounding presents completely different flora and environmental conditions. This may isolate populations of plants and animals from the other portion of this ecosystem in lowlands. It is widely accepted that these patches are result of Holocene expansion of the humid forest; nevertheless long distance dispersal is also theorized. In this scenario the bromeliad *Hohenbergia ridleyi* has occurrence in both sites of forest occurrence. These events may generated a genetic trace that can be tracked by rapid mutation markers as microsatellites. This work aimed to clarify the relationships between lowland forests and the ‘Brejos de Altitude’ *H. ridleyi* populations by microsatellite markers, accessing the genetic structure of this species in order to understand interaction patterns between lowland Atlantic Forest and ‘Brejos de Altitude’. The sampling occurred in population in both regions, where in laboratory their DNA were isolated following what is described in the literature. A selection of

informative nuclear microsatellites was conducted through a cross amplification test with primers developed to *Aechmea caudata* and *Ortophytum ophiuroides*. The overall genetic diversity found was $H_o = 0.7163$ and $H_e = 0.7561$, where no big deviations on Hardy-Weinberg equilibrium were detected. AMOVA results shows that the most of genetic diversity is due differences among individuals inside populations (91,11%), what is expected when the observed heterozigosity per population is about the expected. The F_{st} values (0.08; $p \geq 0.0001$) suggest high similarities between populations and corroborates with an efficient gene flow. As so as the five genetic groups identified by Bayesian clustering suggests the strong connectivity of the populations. This results are also supported by the positive gene flow between populations ($N_m = 1.41$). Our results supports the considerable connectivity between 'Brejos de Altitude' and lowland Atlantic Forest *H. ridleyi* populations, confirming that populations from these different sites have the same origin, what supports both biogeographical hypothesis, ensuring relations between at least part of the 'Brejos de Altitude' and lowland Atlantic Forest flora. An effective pollination and seed dispersal is expected for this species, this is consistent with a long distance dispersal colonization, in what midway populations can act as stepping stones and a booster for gene flow. Lastly, the results here presented reinforces the importance of other molecular studies to better understand biogeographical patters, as so as to give relevant information for establishment of effective environmental management and conservation actions.

Funding: CNPq; FACEPE and UFPE.

3. Resumo apresentado no XI congresso latinoamericano de Botânica – Salvador – BA – 2015.



MICROSATELLITE MARKERS APPLIED TO POPULATION GENETIC STUDIES OF *HOHENBERGIA CATINGAE* NATURAL POPULATIONS

AUTOR(ES): Rodrigo César Gonçalves de Oliveira; Hévila Mendes Silva; Maria das Graças Lapa Waderley; Ana Maria Benko-Iseppon;

INSTITUIÇÃO:

Universidade Federal de Pernambuco-UFPE - Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal

Microsatellites are largely applied for population genetic studies of native plants providing important insights on evolutionary field, especially in what regards to Bromeliads. These plants have been largely studied on this approach due its huge diversity of species, habit and complicated phylogeny. In particular the species *Hohenbergia cattingae* Ule., largely spread through Caatinga Seasonal Dry Tropical Forest (SDTF). This species presents high morphological differences and four varieties accepted; these are distributed in well defined populations on rocky outcrops. In order to better define the species morphological variation and identify genetic structure patterns, microsatellite markers were applied on seven populations of *H. cattingae* from different regions of northeast Brazil. On this propose a cross transfer of markers developed for close species is one of the best ways for harvest polymorphic and informative microsatellites in order to reduce application and analysis costs. In total 69 primers prior developed for *Aechmea caudata*, *Ananas comosus* and *Ortophytum ophiuroides* were tested on a subset of populations, which 17 presented transferable and polymorphic on *H. cattingae*. Results with the applied primers points to a lack of heterozygosity ($H_e = 0.350$; $H_o = 0.268$) that could be due effects of inbreeding ($F_{is} = 0.166$). Genetic clustering provided by Bayesian clustering resulted in $K=3$ and the admixture between populations makes clear the relations among varieties, even though admixture among populations is considerable. Values of F-statistic provided by AMOVA analysis among populations led to conclusions that high differentiation levels ($F_{st} = 0.338$), what uphold evidences for inbreeding. Results and analysis here presented led us to conclude that gene flow between populations is very restrict, it is expected that pollinators (Hummingbirds) behavior allows just pollination with relatives, these fact may be also related to restrictions on seed dispersal. It is expected that plants with high genetic isolation levels that populate specific areas, as rocky outcrops, present a huge differentiation among populations in big areas. (FACEPE, CAPES e CNPQ)

Key-words: SSR, Evolution, Molecular Ecology.

4. Resumo apresentado no IX ENGENE – Campina Grande – PB – 2014

Estrutura genética populacional de espécies de *Hohenbergia* suporta conectividade entre populações de Brejos de Altitude e Floresta Atlântica no estado de Pernambuco, Brasil.

Mendes-Silva, H^{1,2}; Gonçalves-Oliveira, RC^{1,3}; Wanderley, MGL.⁴ Benko-Iseppon, AM^{1,2,3}.

¹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Dept. de Genética, CCB, UFPE, Recife, PE.

²Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, CCB, UFPE, Recife, PE.

³Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, CCB, UFPE, Recife, PE.

⁴Herbário SP, Instituto de Botânica de São Paulo, Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, SP.

hevila.ufpe@gmail.com

Palavras-chave: Brejo de altitude, Floresta Atlântica, SSR, *Hohenbergia ridley*, *Hohenbergia ramageana*

Na família Bromeliaceae o gênero *Hohenbergia* figura entre os mais derivados, compreendendo 66 espécies. Neste gênero *H. ridleyi* e *H. ramageana* compartilham caracteres que normalmente são utilizados para a identificação das espécies, não havendo um consenso quanto à sua delimitação específica. Assim, sua taxonomia é bastante confusa, alguns tratando os nomes como sinônimos e outros mantendo a configuração de duas espécies. Além disso, outras questões como a distribuição disjunta entre a Floresta Atlântica e regiões de Brejos de Altitude fazem desse complexo específico um bom modelo para estudos biogeográficos. Marcadores moleculares do tipo SSR têm se mostrado como uma ferramenta muito eficiente em estudos populacionais com plantas nativas, produzindo informações relevantes quanto à estrutura genética, efeitos biogeográficos, hibridizações e coesão de espécies. O objetivo desse trabalho foi fornecer subsídios para a delimitação do complexo específico *H. ridleyi* x *H. ramageana*, caracterizando sua diversidade e a estrutura genética entre suas populações. Indivíduos de *H. ridleyi* e *H. ramageana* foram coletados em região de Floresta Atlântica e em brejos de altitude, sendo seu DNA total extraído usando um protocolo CTAB adaptado. Testes de amplificação heteróloga com 11 *primers* anteriormente desenvolvidos para *Aechmea caudata* foram realizados, sendo aplicados 4 *primers* mais polimórficos. Os índices de polimorfismo foram altos, apontando que os *primers* foram efetivos. A diversidade genética encontrada foi de $H_o = 0.7163$ e $H_e = 0.7561$, apontando para um excesso de heterozigotos na maioria das populações, fato que pode estar associado a processos de seleção e deriva genética. Em relação à estruturação, a maioria da diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações (92%), o que significa que a diversidade intrapopulacional é alta, corroborando com os índices de heterozigosidade observados. O valor de F_{st} (0,1906; $p \geq 0,0001$) sugere que não há diferenciação entre as populações, o que condiz com os níveis de compartilhamento de diversidade encontrados entre populações (8%). De acordo com os dados de agrupamento gerado por análise Bayesiana foram identificados três grupos ($K=3$), um destes relacionado a uma população do município de Goiana (PE). Tal fato foi suportado pelos resultados de F_{st} par a par onde a diferenciação entre esta população e as demais é sempre considerável. Os dados de diferenciação e estruturação genética também denotam a existência de fluxo gênico positivo entre as populações de *H. ramageana* e *H. ridleyi* ($N_m=1,41$). Adicionalmente, nossos resultados suportam as teorias biogeográficas que

sugerem conectividade entre os brejos de altitude e Floresta Atlântica. Adicionalmente apontam para uma correlação de fluxo gênico entre as espécies, corroborando com a ideia de uma única espécie. Por fim, os resultados aqui apresentados reiteram a importância de análises moleculares para uma compreensão mais segura quanto à delimitação de espécies, bem como o estabelecimento de estratégias de manejo e conservação.

Suporte Financeiro: CNPq; CAPES; FACEPE.

5. Poster apresentado no Seminário do DAAD para estudantes brasileiros - Bonn 2015

Seminar for PhD scholars from Brazil

25./26.09.2015 in Bonn

- Market of Research-

Phylogeography of Caatinga: an evolutionary perspective based on Bromeliaceae.

Outcomes

Epiphytic Over niche

The working here presented based on the actual climatic data (BiC) was added based on WORLDCLIM layers (BI1 - Annual temperature, BI2 - Temperature of the driest quarter, BI12 - Annual precipitation, BI122 - Precipitation of the drier season) and BIOCLIM and MAXNET algorithms. The values of BI1 and BI22 were used for niche model element that MAXNET models are more reliable than the BIOCLIM. Even though both programs returns a nice scenario for epiphytic related to Atlantic forest and highlands plants, related to Caatinga SPP. The availability of water and temperature seems to be strong factors for the distribution of many subgenus plants, these plants seems to be highly adapted to the environment. Continuously reproductive are more likely for common area and areas, in some species as to related and characters that are found on Atlantic forest of Caatinga and Atlantic Forest. The tested algorithms GDM phylogenetics and niche modelling seems to be important for reconstruction and to our niche modelling. Our model for it, using Fig. 4) predicts stability for Caatinga areas. The outcomes of the phylogeography have revealed to south of Atlantic stability but shows stability on low latitudes. As well as the past occurrence of the temperate in central Caatinga during the last glacial and Last Glacial Maximum is compared with the genetic structure (Fig. 1, Table 1, and 2) of the present data, and the actual genetic diversity may be related to the Pleistocene Extinctions.

Stability of Caatinga in Pleistocene climatic changes

Year	Forest	Caatinga	Stability
18000	High	Low	High
12000	High	Low	High
10000	High	Low	High
8000	High	Low	High
6000	High	Low	High
4000	High	Low	High
2000	High	Low	High
0	High	Low	High

Addressing the problems

Epiphytic Over niche

The working here presented based on the actual climatic data (BiC) was added based on WORLDCLIM layers (BI1 - Annual temperature, BI2 - Temperature of the driest quarter, BI12 - Annual precipitation, BI122 - Precipitation of the drier season) and BIOCLIM and MAXNET algorithms. The values of BI1 and BI22 were used for niche model element that MAXNET models are more reliable than the BIOCLIM. Even though both programs returns a nice scenario for epiphytic related to Atlantic forest and highlands plants, related to Caatinga SPP. The availability of water and temperature seems to be strong factors for the distribution of many subgenus plants, these plants seems to be highly adapted to the environment. Continuously reproductive are more likely for common area and areas, in some species as to related and characters that are found on Atlantic forest of Caatinga and Atlantic Forest. The tested algorithms GDM phylogenetics and niche modelling seems to be important for reconstruction and to our niche modelling. Our model for it, using Fig. 4) predicts stability for Caatinga areas. The outcomes of the phylogeography have revealed to south of Atlantic stability but shows stability on low latitudes. As well as the past occurrence of the temperate in central Caatinga during the last glacial and Last Glacial Maximum is compared with the genetic structure (Fig. 1, Table 1, and 2) of the present data, and the actual genetic diversity may be related to the Pleistocene Extinctions.

Distribution niche

The working here presented based on the actual climatic data (BiC) was added based on WORLDCLIM layers (BI1 - Annual temperature, BI2 - Temperature of the driest quarter, BI12 - Annual precipitation, BI122 - Precipitation of the drier season) and BIOCLIM and MAXNET algorithms. The values of BI1 and BI22 were used for niche model element that MAXNET models are more reliable than the BIOCLIM. Even though both programs returns a nice scenario for epiphytic related to Atlantic forest and highlands plants, related to Caatinga SPP. The availability of water and temperature seems to be strong factors for the distribution of many subgenus plants, these plants seems to be highly adapted to the environment. Continuously reproductive are more likely for common area and areas, in some species as to related and characters that are found on Atlantic forest of Caatinga and Atlantic Forest. The tested algorithms GDM phylogenetics and niche modelling seems to be important for reconstruction and to our niche modelling. Our model for it, using Fig. 4) predicts stability for Caatinga areas. The outcomes of the phylogeography have revealed to south of Atlantic stability but shows stability on low latitudes. As well as the past occurrence of the temperate in central Caatinga during the last glacial and Last Glacial Maximum is compared with the genetic structure (Fig. 1, Table 1, and 2) of the present data, and the actual genetic diversity may be related to the Pleistocene Extinctions.

Niche modelling

The working here presented based on the actual climatic data (BiC) was added based on WORLDCLIM layers (BI1 - Annual temperature, BI2 - Temperature of the driest quarter, BI12 - Annual precipitation, BI122 - Precipitation of the drier season) and BIOCLIM and MAXNET algorithms. The values of BI1 and BI22 were used for niche model element that MAXNET models are more reliable than the BIOCLIM. Even though both programs returns a nice scenario for epiphytic related to Atlantic forest and highlands plants, related to Caatinga SPP. The availability of water and temperature seems to be strong factors for the distribution of many subgenus plants, these plants seems to be highly adapted to the environment. Continuously reproductive are more likely for common area and areas, in some species as to related and characters that are found on Atlantic forest of Caatinga and Atlantic Forest. The tested algorithms GDM phylogenetics and niche modelling seems to be important for reconstruction and to our niche modelling. Our model for it, using Fig. 4) predicts stability for Caatinga areas. The outcomes of the phylogeography have revealed to south of Atlantic stability but shows stability on low latitudes. As well as the past occurrence of the temperate in central Caatinga during the last glacial and Last Glacial Maximum is compared with the genetic structure (Fig. 1, Table 1, and 2) of the present data, and the actual genetic diversity may be related to the Pleistocene Extinctions.

Other Authors: Ana Maria Barros-Hopmann, Sergio Zúñiga, Eliete Lanza, Helene Mendes Silva, Marco Antonio de Lacerda Wanderley, Luciana Heller.

Name: Rodrigo César Gonçalves-Oliveira
University: Senckenberg Forschungsinstitut Geobotanik
Email address: rod.bogen@gmail.com

Opportunities for Networking:

I am offering: Population Genetics, Niche Modelling, Phylogenetics, Evolution, Molecular Ecology, Tropical Ecology, Taxonomy of Bromeliaceae.

I am looking for: Niche modelling, Population Genetics, Phylogenomics and Epigenetics applied to Phylogeny, Phylogeography, Paleoecology.

Deutscher Akademischer Austauschdienst
German Academic Exchange Service

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CIÊNCIA
SEM Fronteiras
ALEMANHA