

DÉBORA MARIA CAVALCANTI FERREIRA

DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E FILOGEOGRAFIA DO  
COMPLEXO *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis. (BROMELIACEAE)

RECIFE

2016

DÉBORA MARIA CAVALCANTI FERREIRA

DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E FILOGEOGRAFIA DO  
COMPLEXO *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis. (BROMELIACEAE)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Batista Louzada  
Co-orientadora: Dra. Clarisse Palma da Silva  
Área de concentração: Florística e Sistemática  
Linha de Pesquisa: Florística e Sistemática de Angiospermas

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ferreira, Débora Maria Cavalcanti

Delimitação de espécies e filogeografia do complexo *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis.  
(Bromeliaceae) / Débora Maria Cavalcanti Ferreira. – Recife: O Autor, 2016.  
72 f.: il.

Orientadores: Rafael Batista Louzada, Clarisse Palma da Silva  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro  
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, 2016.  
Inclui referências e anexos

1. Mata Atlântica 2. Genética de populações I. Louzada, Rafael |  
Batista (orient.) II. Silva, Clarisse Palma (coorient.) III. Título.

634.909811

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-305

DÉBORA MARIA CAVALCANTI FERREIRA

“DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E FILOGEOGRAFIA DO  
COMPLEXO *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis. (Bromeliaceae)”

APROVADA EM 29/02/2016

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr. Rafael Batista Louzada (Orientador) - UFPE

---

Dr. Rodrigo Augusto Torres - UFPE

---

Dra. Andrea Pedrosa Harand - UFPE

RECIFE-PE

2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Rafael Batista Louzada pela atenção, confiança, parceria e oportunidade de estudar um grupo novo com uma abordagem diferente.

À minha co-orientadora Clarisse Palma da Silva pela oportunidade de realizar o estágio em Rio Claro e por todos os ensinamentos e reuniões semanais.

À colaboradora Ana Benko pela parceria e por ceder o laboratório para eu realizar a minha pesquisa.

Ao colaborador Diego Sotero que me introduziu à genética vegetal me ensinando diversas técnicas. Pela amizade e por me entusiasmar a desenvolver esse projeto.

À grande colaboradora Jordana Néri que me ensinou muito sobre a genética vegetal, e estava sempre disposta a me ajudar a utilizar os diversos programas computacionais. A maior parte desse projeto foi desenvolvido com a ajuda dela. Agradeço demais pela atenção, carinho, convivência e amizade.

A colaboradora Maria Cláudia pela ajuda e ensinamentos sobre modelagem de nicho ecológico.

À João Batista que me ajudou bastante em várias coletas e pela troca de informações sobre o gênero *Cryptanthus*.

A todos do laboratório Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE, em especial à Santelmo, Hévila, Rodrigo, Wilson, Diogo (meu irmão) e Marx pelos ensinamentos, pela ajuda das mais diversas e pelas dúvidas tiradas.

A todos do Laboratório de Morfo-Taxonomia Vegetal (Bruno, Danielly, Thales, Edlley, Andreia, Márcio, Beth, Naédja, Fábio, Marily, Layse, Camila, Clovis, Rosália e Beta) pela convivência, discussões e ajuda nas coletas. Em especial a Jefferson e Júlio César pela ajuda nas extrações de DNA, ao meu ex-orientador Marccus Alves pelas discussões e diversas dúvidas tiradas e a Regina Carvalho pelas ilustrações da minha dissertação e pelo carinho de sempre.

À Hidelbrando pela grande ajuda nas questões burocráticas.

À todos do Laboratório de Ecologia Molecular da UNESP-Rio Claro em especial à Fernandinha, Bruno, Bárbara e Cleber, pelos dias felizes em Rio Claro, pelas risadas, conversas, ajudas e convivência.

À Sergio do CEIS pela genotipagem das minhas amostras.

À Rafael Farias e à Raissa pela ajuda nas coletas.

Aos grandes amigos, Isabelle, Espósito e Artur, pelo incentivo, pela ajuda e pelas discussões sobre a minha pesquisa. Aos amigos de graduação, de Recife, de Noronha e de Rio Claro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pelos dois anos de bolsa de mestrado concedida e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo Auxílio Mobilidade Discente (AMD) que me proporcionou a realizar um estágio no Laboratório de Ecologia Molecular na UNESP-Rio Claro.

Aos projetos que financiaram o desenvolvimento da minha pesquisa, Projeto Universal financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (449686/2014-0), Projeto Floresta Atlântica, financiado pelo CNPq, NSF (DEB-0946618), Velux Stiftung e Beneficia Foundation.

À todos os gestores das unidades de conservação visitadas e auxiliares de campo.

E principalmente à minha família, por me apoiar em todas as minhas decisões, pelo amor e carinho. Agradeço principalmente aos meus pais (Marceli e José), pelo esforço que tiveram para me manter em boas escolas e pelo incentivo de sempre.

Muito obrigada!!!

## RESUMO

*Cryptanthus* Otto & A.Dietr. (Bromeliaceae, Bromelioideae) é um gênero endêmico do Brasil. *Cryptanthus burle-marxii* Leme e *C. zonatus* (Vis.) Vis. são restritas ao norte da Floresta Atlântica nordestina e não apresentam delimitação taxonômica bem definida, pois muitos de seus caracteres morfológicos se sobrepõem. Ambas as espécies compõem o complexo *C. zonatus* (Vis.) Vis.. O objetivo do presente estudo foi realizar a delimitação de espécies e descrever os padrões filogeográficos do complexo *C. zonatus*, utilizando dados morfológicos, moleculares e de modelagem de nicho ecológico. Para o estudo foram feitos testes de amplificação heteróloga em *C. burle-marxii* e *C. zonatus*, utilizando 38 locos de microssatélites nucleares de cinco espécies de Bromeliaceae. Dos 38 locos testados, 24 apresentaram amplificação positiva e 13 foram polimórficos. Dez locos polimórficos foram selecionados para serem amplificados e genotipados em 147 indivíduos de oito populações do complexo *C. zonatus*. O resultado da análise morfológica e de estrutura genética mostrou que *C. burle-marxii* e *C. zonatus* são dois nomes dados à mesma espécie. A análise filogeográfica mostrou que a distribuição geográfica e estrutura genética do complexo *C. zonatus* pode ter sofrido modificações no quaternário. No último máximo glacial a distribuição geográfica potencial do complexo era contínua e maior em algumas áreas que atualmente é mar, o que deve ter ocorrido provavelmente devido à regressão marinha neste local. No Holoceno médio houve a potencial separação da distribuição possivelmente devido a uma barreira ecológica que perdurou até o presente formando dois grupos geneticamente estruturados, um ao norte e outro ao sul. Para a conservação da espécie foram indicadas populações prioritárias para o estabelecimento de unidades de conservação.

Palavras-chave: Amplificação heteróloga, *Cryptanthus burle-marxii*, diversidade genética, estrutura genética, Floresta Atlântica, genética de populações, microssatélites, SSR.

## ABSTRACT

*Cryptanthus* Otto & A.Dietr. (Bromeliaceae, Bromelioideae) is an endemic genus from Brazil. *Cryptanthus burle-marxii* Leme and *C. zonatus* (Vis.) Vis. are species restricted to the north of the northeastern Atlantic Forest and have no well-defined taxonomic delimitation due to overlapping of some morphological characters. Both species are included in the *Cryptanthus zonatus* complex. The main goal of this study was to delimit species boundaries and to describe the phylogeographic patterns of the complex *C. zonatus* using morphological, molecular and ecological niche modeling data. For this study were carried out cross-amplification tests in *C. burle-marxii* and *C. zonatus* using 38 loci of nuclear microsatellite of five species of Bromeliaceae. Of the 38 loci tested, 24 showed positive amplification and 13 were polymorphic. Ten polymorphic loci were selected to be amplified and genotypes in 147 individuals from eight populations of the complex *C. zonatus*. The results of the morphological and genetic structure analyses showed that *C. burle-marxii* and *C. zonatus* are two names given to the same species. The phylogeographic analysis showed that the geographic distribution and genetic structure of the complex *C. zonatus* may have been modified in the Quaternary. The potential geographic distribution of the complex in the last glacial maximum was continuous and larger in some areas which are sea in present, what have probably occurred due to marine regression at this location. In the middle Holocene, there was the potential separation of distribution, possibly due to an ecological barrier that lasted until the present, forming two genetically structured groups, one in the north and other in the south. For conservation of the species priority populations were indicated for the establishment of protected areas.

Keywords: Atlantic Forest, cross-amplification, *Cryptanthus burle-marxii*, genetic diversity, genetic structure, population genetics, microsatellite, SSR.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Table 1** - Location of the sampled populations and number of individuals collected of *C. burle-marxii* and *C. zonatus*.....27

**Table 2** - Cross-amplification of 38 nuclear microsatellite markers previously developed for different Bromeliaceae species in *Cryptanthus burle-marxii* and *Cryptanthus zonatus*.28

**Table 3** – Genetic diversity estimate to ten polymorphic loci of nuclear microsatellite transferred to *Cryptanthus burle-marxii* and *Cryptanthus zonatus*.....29

### CAPÍTULO II

**Tabela 1**- Abreviações, estados, municípios, localidades, coordenadas geográficas e espécimes testemunhos das populações amostradas do complexo *Cryptanthus zonatus* ....63

**Tabela 2**- Caracteres indicados por Leme & Siqueira-Filho (2006), que diferencia *Cryptanthus burle-marxii* de *Cryptanthus zonatus* .....64

**Tabela 3**- Características morfológicas de seis populações do complexo *Cryptanthus zonatus*. Para as abreviações das populações ver Tabela 1 .....65

**Tabela 4** – Caracterização das populações do complexo *Cryptanthus zonatus* com dez microssatélites nucleares, incluindo o tamanho da amostra (N), número de clones (N clones), número de alelos (A), número de alelos privados (PA), riqueza alélica (AR), variância do tamanho do alelo (Var), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e valor do P da análise de gargalo genético (Bo). Para as abreviações das populações ver Tabela 1 .....66

**Tabela 5** – Caracterização de dez marcadores microssatélites nucleares nas populações do complexo *Cryptanthus zonatus*, incluindo a fonte do marcador, intervalo do tamanho molecular em pares de base (bp), número de alelos ( $A$ ), riqueza alélica ( $AR$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), coeficiente total de endogamia ( $F_{IT}$ ) e índice de fixação ( $F_{ST}$ ). Para as abreviações dos locos ver os materiais e métodos .....67

**Tabela 6** – Análise de variância molecular ( $AMOVA$ ) para microssatélites nucleares .....68

**Tabela 7** – Tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) e número efetivo de migrantes ( $N_{em}$ ) entre os pares de populações, para as populações do complexo *Cryptanthus zonatus*, estimados seguindo Beerli & Felsenstein (1999) com o programa MIGRATE 2.0.6. Para as abreviações das populações ver Tabela 1.....69

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Distribuição geográfica das populações amostradas do complexo *Cryptanthus zonatus* na Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil. A área demarcada em cinza representa os limites históricos da Floresta Atlântica. Para as abreviaturas das populações ver a Tabela 1 .....57

**Figura 2** – Oito populações amostradas do complexo *Cryptanthus zonatus*. A-B. Parque Estadual das Dunas de Natal. C-E. RPPN Mata Estrela. F. Mineradora Cristal. G. Usina São José. H. Estação Ecológica de Caetés. I. RPPN Serra do Contente. J-L. Mata do Cupe. M-O. RPPN Nossa Senhora do Outeiro de Maracaípe .....58

**Figura 3** – Magnitude do Delta  $K$  da análise da estrutura genética em função do  $K$  calculado com base no método Delta  $K$  proposto por Evanno et al. (2005), para os dados de microssatélites das populações do complexo *Cryptanthus zonatus*. O valor modal dessas distribuições indica o  $K$  verdadeiro, o melhor  $K$  é o  $K=2$  (dois agrupamentos genéticos)..59

**Figura 4** – Proporção de mistura ( $Q$ ) para cada indivíduo do complexo *Cryptanthus zonatus* para o número de agrupamentos mais provável  $K=2$  (dois agrupamentos genéticos). Os dois agrupamentos genéticos identificados pelo STRUCTURE são indicados em cores diferentes e as populações estão separadas por barras verticais. Para as abreviaturas das populações ver a Tabela 1 .....60

**Figura 5-** Árvore neighbor-joining não enraizada das populações do complexo *Cryptanthus zonatus* com base em Cavalli-Sforza & Edward's (1967), incluindo os valores de bootstrap. A escala para a distância genética é fornecida na parte inferior do gráfico. Para as abreviaturas das populações ver a Tabela 1 .....61

**Figura 6-** Modelagem de nicho ecológico utilizando o algoritmo Bioclim, com as distribuições potenciais e probabilidade de ocorrência do complexo *Cryptanthus zonatus* no último máximo glacial (UMG: ~22.000 anos atrás) (A), no Holoceno médio (HM: ~6.000 anos atrás) (B) e no presente (C).....62

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>APRESENTAÇÃO</b> .....                                                                                                                               | 1  |
| <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....                                                                                                                      | 2  |
| BROMELIACEAE .....                                                                                                                                      | 2  |
| O GÊNERO <i>Cryptanthus</i> .....                                                                                                                       | 3  |
| COMPLEXO <i>Cryptanthus zonatus</i> .....                                                                                                               | 5  |
| ESTUDOS MOLECULARES PARA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES .....                                                                                                  | 7  |
| FILOGEOGRAFIA.....                                                                                                                                      | 8  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                                                                                 | 9  |
| <b>CAPÍTULO I – Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in two species of <i>Cryptanthus</i> Otto &amp; A.Dietr. (Bromeliaceae)</b> ..... | 15 |
| Abstract.....                                                                                                                                           | 17 |
| Introduction .....                                                                                                                                      | 18 |
| Materials and methods.....                                                                                                                              | 19 |
| Results and discussion .....                                                                                                                            | 20 |
| Acknowledgements .....                                                                                                                                  | 22 |
| References .....                                                                                                                                        | 22 |
| <b>CAPÍTULO II - Delimitação de espécies e filogeografia do complexo <i>Cryptanthus zonatus</i> (Vis.) Vis. (Bromeliaceae)</b> .....                    | 30 |
| Resumo .....                                                                                                                                            | 32 |
| Introdução.....                                                                                                                                         | 33 |
| Materiais e Métodos .....                                                                                                                               | 35 |
| Resultados.....                                                                                                                                         | 39 |
| Discussão .....                                                                                                                                         | 42 |
| Conclusões.....                                                                                                                                         | 47 |
| Agradecimentos .....                                                                                                                                    | 48 |
| Referências bibliográficas .....                                                                                                                        | 48 |
| <b>CONCLUSÕES</b> .....                                                                                                                                 | 70 |
| <b>ANEXOS</b> .....                                                                                                                                     | 71 |

## 1. APRESENTAÇÃO

O gênero *Cryptanthus* (Bromeliaceae) é endêmico do Brasil e ocorre em áreas de Floresta Atlântica, campos rupestres e Caatinga. Dentre as espécies do gênero, duas espécies (*Cryptanthus burle-marxii* Leme e *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis.) restritas ao norte da Floresta Atlântica do Nordeste, compõem o complexo *Cryptanthus zonatus* e são difíceis de serem identificadas pois os seus caracteres morfológicos se sobrepõem. O objetivo do presente estudo foi realizar a delimitação de espécies e descrever os padrões filogeográficos do complexo *C. zonatus*, utilizando dados morfológicos, moleculares e de modelagem de nicho ecológico.

A dissertação está dividida em três partes: fundamentação teórica, capítulo I e capítulo II. Na fundamentação teórica são apresentados tópicos que abordam aspectos sobre a família Bromeliaceae, o gênero *Cryptanthus*, o complexo *Cryptanthus zonatus*, estudos moleculares para a delimitação de espécies e filogeografia.

No capítulo I, referente ao manuscrito intitulado “Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in two species of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae)”, são mostrados testes de amplificação heteróloga utilizando 38 locos de microssatélites nucleares de cinco espécies do Bromeliaceae, realizados em duas espécies do gênero *Cryptanthus* (*C. burle-marxii* e *C. zonatus*).

No capítulo II, intitulado “Delimitação de espécies e filogeografia do complexo *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis. (Bromeliaceae)”, foram reunidos dados de morfologia, diversidade e estrutura genética de oito populações usando marcadores microssatélites nucleares, e modelagem de nicho ecológico do complexo *C. zonatus*, com o objetivo de responder a três questões: 1) *Cryptanthus burle-marxii* e *C. zonatus* são dois nomes atribuídos à mesma espécie? 2) Como as mudanças climáticas do quaternário modificaram a distribuição geográfica e estrutura genética do complexo *C. zonatus*? 3) Quais são as implicações do estudo integrativo para a conservação do complexo *C. zonatus*?

No final da dissertação são apresentadas as normas para a publicação no periódico Brazilian Journal of Botany, referente ao manuscrito I e as normas do periódico Botanical Journal of the Linnean Society, referente ao manuscrito II.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. BROMELIACEAE

Bromeliaceae (Poales, de acordo com o APG III (2009)) apresenta 3.489 espécies, pertencentes a 56 gêneros (Butcher & Gouda 2016), e está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do novo mundo (Givnish *et al.* 2011), com exceção da espécie *Pitcairnia feliciania* (A. Chev.) Harms & Mildbr., que ocorre na costa oeste do continente africano (Smith & Downs 1974; Jaques-Felix 2000; Givnish *et al.* 2004). Segundo Wanderley *et al.* (2007), os dois maiores centros de diversidade da família são o leste do Brasil e a região dos Tepuis na Venezuela. No Brasil, Bromeliaceae está representada por 1.343 espécies distribuídas em 44 gêneros, ocorrendo nos domínios da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Forzza *et al.* 2016a).

Quanto à morfologia, as espécies da família são ervas perenes, terrícolas, epífitas ou rupícolas, de poucos centímetros de altura até lenhosas de grande porte, podendo ultrapassar 10 m de altura em *Puya* Molina (Wanderley *et al.* 2007). O caule geralmente é curto, encoberto pelas bainhas foliares que estão dispostas em roseta ou, mais raramente, o caule é desenvolvido e alongado (Wanderley *et al.* 2007). As folhas são alternas, espiraladas, polísticas, raramente dísticas, formando ou não um reservatório de água e detritos orgânicos (Wanderley *et al.* 2007). As inflorescências são simples ou compostas. As flores são sésseis ou pediceladas, bissexuadas ou raramente funcionalmente unissexuadas, trímeras (Wanderley *et al.* 2007). O ovário é súpero, semi-ínfero ou ínfero, o fruto é baga, algumas vezes bem desenvolvido (*Bromelia* L.), ou cápsula, em geral septicida, no gênero *Ananas* Mill. há a presença de fruto composto (Wanderley *et al.* 2007).

Do ponto de vista econômico, Bromeliaceae apresenta uma longa história de uso etnobotânico como fonte de fibras, alimentos, forragens, medicamentos, além do uso místico e ornamental (Bennett 2000; Manetti *et al.* 2009). O uso ornamental vem causando o declínio das populações naturais de algumas espécies da família, vários gêneros são cultivados como ornamentais e conhecidos popularmente como bromélias, gravatás ou caraguatás, tais como *Aechmea* Ruiz & Pav., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, *Billbergia* Thunb., *Guzmania* Ruiz & Pav., *Neoregelia* L. B. Sm., *Pitcairnia* L'Hér., *Vriesea* Lindl. e muitos outros (Souza & Lorenzi 2008).

Bromeliaceae é tradicionalmente dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith & Downs 1974). Porém, os estudos filogenéticos de Givnish *et al.* (2007), mostram que Tillandsioideae e Bromelioideae são monofiléticas e podem ser mantidas, mas Pitcairnioideae é parafilética, requerendo a divisão desta tradicional subfamília em Puyoideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Brocchinioideae, Pitcairnioideae e Navioideae. Portanto, o número de subfamílias foi ampliado para oito.

Quanto aos estudos taxonômicos, importantes trabalhos foram publicados para a família, tais como a *Flora Brasiliensis* (Mez 1892), a *Monographiae Phanerogamarum* (Mez 1896), *Das Pflanzenreich* (Mez 1934-1935), e a *Flora Neotropica*, que é o trabalho mais completo da família, dividido em três volumes (Smith & Downs 1974, 1977, 1979).

## 2.2. O GÊNERO *Cryptanthus*

O gênero *Cryptanthus* pertence à subfamília Bromelioideae (Ramírez-Morillo 1996) e ao clado Eu-bromelioids, sendo a primeira linhagem divergente deste clado (Schulte *et al.* 2009). É um gênero endêmico do Brasil que ocorre em áreas de Floresta Atlântica, campos rupestres e Caatinga, desde o nível do mar até 2000 m de elevação (Ramírez-Morillo 1996). Apresenta 78 espécies que estão distribuídas nas regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) do Brasil (Forzza *et al.* 2016b).

Os representantes do gênero são plantas terrícolas ou saxícolas, em geral esciófilas, com exemplos de heliófilas (Leme & Siqueira-Filho 2006). Apresentam folhas em rosetas, geralmente liguladas ou ocasionalmente com pecíolos bem definidos (Ramírez-Morillo 1996). As margens das folhas podem ser uniformemente onduladas ou inteiras, ou algumas vezes serreadas apenas na base, e ter acúleos de até 5 mm de comprimento em algumas espécies. As inflorescências são compostas e geralmente possuem 2-3 flores, ou mais raramente simples. O ovário é ínfero e os frutos são bagas (Ramírez-Morillo 1996). *Cryptanthus* apresenta algumas características distintas da família Bromeliaceae, características autapomórficas incluem a tendência para andromonoiccia e os números cromossômicos relatados de  $2n = 34, 36, 54$  são diferentes dos encontrados para a maioria dos membros da família  $2n = 50$  (Ramírez-Morillo & Brown 2001).

*Cryptanthus* está organizado em dois subgêneros, proposto por Mez (1896) e aceito por Ramírez-Morillo (1996). *Cryptanthus* subg. *Cryptanthus* é caracterizado principalmente por possuir flores com tendência a andromonoiccia e *Cryptanthus* subg. *Hoplocryptanthus* possui flores hermafroditas (Ramírez-Morillo 1996). As espécies do subgênero *Cryptanthus* ocorrem desde o Rio de Janeiro (limite sul), passando por Minas Gerais e Espírito Santo, atingindo o Nordeste até o Rio Grande do Norte, preferindo faixas de elevação próximas ao nível do mar até cotas em torno de 700 m (Leme & Siqueira-Filho 2006). Já as espécies de *Hoplocryptanthus* estão concentradas no Espírito Santo e em Minas Gerais, prevalecendo em sítios muito úmidos com elevação superior a 600 m (Leme & Siqueira-Filho 2006).

Do ponto de vista econômico, as espécies do gênero são utilizadas como ornamental, como exemplo tem *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis., que é uma das espécies mais ornamentais e populares do gênero, encontrando-se amplamente difundida em cultivo há mais de 150 anos (Leme & Siqueira-Filho 2006), e *Cryptanthus burle-marxii* Leme (Fundação biodiversitas 2005).

Algumas espécies do gênero estão presentes em listas de espécies ameaçadas de extinção, sendo cinco espécies encontradas na lista da Fundação Biodiversitas (2005), duas espécies na lista do Ministério do Meio Ambiente (2008), e 12 espécies no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Forzza *et al.* 2013).

Alguns tratamentos taxonômicos foram feitos para o gênero, Mez (1896), apresentou a descrição de oito espécies, Smith & Downs (1979), 20 espécies e Ramírez-Morillo (1996), 38 espécies. Em uma flora local para as espécies do gênero da Floresta Atlântica do estado de Alagoas e Pernambuco, o tratamento taxonômico incluiu oito espécies (Leme & Siqueira-Filho 2006).

Segundo Ramírez-Morillo (1996), *Cryptanthus* tem como grupo irmão o gênero *Orthophytum* Beer. Porém, os estudos de Louzada *et al.* (2014) apontam que *Cryptanthus* é polifilético, embora, a amostragem ainda seja considerada insuficiente (8 spp.) para determinar as relações filogenéticas de *Cryptanthus* e definir qual grupo representa a linhagem irmã. Cruz (2013) em uma filogenia de *Cryptanthus* com base em marcadores AFLP, corrobora o monofiletismo de *Cryptanthus* subg. *Cryptanthus*, e refuta o monofiletismo do subgênero *Hoplocryptanthus*, que emerge como parafilético apresentando pelo menos três linhagens distintas. No entanto, em decorrência da limitação

do método de AFLP não foi possível identificar os gêneros filogeneticamente relacionados às linhagens de *Cryptanthus*.

### 2.3. COMPLEXO *Cryptanthus zonatus*

Complexos de espécies são constituídos por espécies relacionadas e que possuem limites morfológicos de difícil interpretação ou sobreposição de caracteres. No gênero *Cryptanthus* há duas espécies que não apresentam delimitação taxonômica bem definida e constituem o complexo *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis. (Ramírez-Morillo 1996; Versieux *et al.* 2013). Anteriormente, *C. fosterianus* era considerada uma espécie do complexo que era apontada como possivelmente extinta na natureza pelo MMA (2008) e pelo Livro Vermelho da Flora do Brasil (Forzza *et al.* 2013). Porém, através da análise morfológica de coleções de herbários, Alves & Marcucci (2015) propuseram a sinonímia de *C. fosterianus* à *C. zonatus*.

As duas espécies remanescentes do complexo *C. zonatus* (*C. burle-marxii* Leme e *C. zonatus* (Vis.) Vis.) são morfológicamente relacionadas por possuírem lâminas foliares com faixas transversais de tricomas lepidotos, que podem estar ausentes em indivíduos da mesma população. Além das características foliares, atributos reprodutivos também se sobrepõem dificultando sua identificação (Ramírez-Morillo 1996; Leme & Siqueira-Filho 2006; Versieux *et al.* 2013).

Ambas são ervas terrícolas, restritas ao norte da Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil (Forzza *et al.*, 2016b). *C. burle-marxii* está distribuída no estado de Pernambuco (Forzza *et al.*, 2016b) em áreas de restinga (Leme & Siqueira-Filho, 2006) enquanto que *C. zonatus* ocorre nos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas e Sergipe (Forzza *et al.*, 2016b) em áreas localizadas no interior incluindo os brejos de altitude (Leme & Siqueira-Filho, 2006). Ambas as espécies estão presentes em listas de espécies ameaçadas, *C. burle-marxii* é considerada como Vulnerável pelo Livro Vermelho da Flora do Brasil (Forzza *et al.* 2013) e pela Fundação Biodiversitas (2005) e *C. zonatus* é classificada como vulnerável (Forzza *et al.* 2013) e criticamente em perigo pela Fundação Biodiversitas (2005).

Quanto à biologia reprodutiva, *Cryptanthus burle-marxii* é uma espécie considerada andromonóica parcial, pois apresentam uma separação temporal da abertura das flores masculinas e hermafroditas (Oliveira-Júnior 2015). Primeiro são produzidas flores masculinas e na metade final da floração são produzidas flores hermafroditas no mesmo indivíduo (Oliveira-Júnior 2015). As flores de *C. burle-marxii* têm características mistas de polinização, néctar próprio de ornitofilia e morfologia de melitofilia (há evidência de presença de osmóforos através da análise de coloração com vermelho neutro que podem explicar o comportamento das abelhas de raspar as pétalas evidenciando biologicamente a presença de odores florais) (Oliveira-Júnior 2015). *Phaetornis ruber* (beija-flor) e *Eulaema nigrita* (abelha) são os polinizadores mais frequentes (Oliveira-Júnior 2015).

As duas espécies são diferenciadas por caracteres vegetativos e reprodutivos (Leme 1990; Leme & Siqueira-Filho 2006). No protólogo de *Cryptanthus burle-marxii* (Leme 1990) e no estudo de Leme & Siqueira-Filho (2006), *C. burle-marxii* é diferenciada de *C. zonatus* pela propagação vegetativa (rizomas vs. gemas axilares), tamanho das folhas (menores 8-20 x 2-4 cm vs. maiores 20-40 x 4-5 cm), comprimento das sépalas (13 mm vs. 15-19 mm) e conação das pétalas (1/3 conadas vs. 1/2 conadas) respectivamente. Além dessas características, Leme & Siqueira-Filho (2006) diferencia *C. burle-marxii* de *C. zonatus* pelo número de flores nos fascículos basais (cerca de 2 vs. cerca de 4) e pelo tamanho das flores (35-40 mm vs. 39-45 mm compr.) respectivamente.

O primeiro registro do complexo foi feito por Ramírez-Morillo (1996), através de análise morfológica de coleções de herbários. A autora indica que trabalhos de campo são necessários para verificar se *C. burle-marxii* e *C. zonatus* são uma única espécie. Na chave de identificação, Ramírez-Morillo (1996) separa *C. burle-marxii* de *C. zonatus* pelo comprimento das sépalas (35 mm vs. 19 mm) e pelo comprimento da bráctea floral em relação ao comprimento da sépala (brácteas com metade do comprimento das sépalas vs. brácteas com o mesmo tamanho das sépalas) respectivamente. A autora ainda indica que os caracteres de reprodução vegetativa não são recomendados para a separação das espécies.

Posteriormente, Versieux *et al.* (2013) analisando um novo registro do complexo para o estado do Rio Grande do Norte, mostram a dificuldade que se tem de para identificar as espécies do complexo e sugerem que um trabalho de genética de populações seja realizado para a resolução taxonômica das espécies do complexo. Além do problema

relacionado à identificação de *C. burle-marxii* e *C. zonatus*, Magalhães (2013) relatou o problema que havia dentro da espécie *C. zonatus*. A espécie apresenta diferentes tipos de colorações nas folhas que já foram considerados como variedades dentro da espécie (Baker 1889) ou como formas (Smith & Downs 1979; Ramírez-Morillo 1996). Porém, Magalhães (2013) comprovou anatomicamente que não havia variação na organização interna dos tecidos das três formas de cor (forma *fuscus*, com folhas vermelhas; forma *viridis*, com folhas verdes e glabras e forma *zonatus*, com faixas de tricomas transversais) e subsidia que todas as três formas sejam tratadas como uma só entidade biológica.

#### 2.4. ESTUDOS MOLECULARES PARA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

A delimitação de espécies é de fundamental importância, pois espécies são as unidades biológicas básicas (Hausdorf & Henning 2010). Espécies são consideradas hipóteses científicas que podem ser corroboradas ou refutadas com a aquisição de novas evidências (Pante *et al.* 2015). Neste contexto, surge a taxonomia integrativa, que utiliza diferentes atributos biológicos (morfologia, genética, distribuição geográfica, habitat ou comportamento) que são analisados através com variados métodos para propor e/ou testar hipóteses de espécies (Pante *et al.* 2015) de modo a reduzir a subjetividade e delimitar táxons específicos de forma mais estável e transparente, estabilizando as inferências taxonômicas (Fujita *et al.* 2012).

Os caracteres moleculares utilizados na taxonomia têm historicamente sido aloenzimas ou cromossomos (número e estrutura de cromossomos), mas hoje, a maioria dos estudos está utilizando principalmente sequências de DNA (Padial *et al.* 2010). Nas últimas duas décadas, o uso de marcadores moleculares como ferramentas para a delimitação de espécies aumentou muito (Duminil & Di Michele 2009). Diversas técnicas têm sido empregadas na delimitação espécies, tanto com marcadores dominantes, tais como ISSR, RAPD (e.g. Passos 2007) e AFLP (e.g. Meudt *et al.* 2009), quanto com codominantes, como exemplo os microsatélites (e.g. Caddah *et al.* 2015; Shao & Xiang 2015).

Dentre os marcadores moleculares, um que merece destaque são os microsatélites, que também são conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeat*) ou STRs (*Single Tandem Repeat*) (Turchetto-Zolet *et al.* 2013). Eles são compostos de unidades curtas (de

dois a seis pares de bases), repetidas uma após a outra (Turchetto-Zolet *et al.* 2013). Nos organismos eucariotos podem ser encontrados tanto nos genomas nucleares como nos organelares (Turchetto-Zolet *et al.* 2013) e são úteis para uma variedade de aplicações em genética de plantas devido a sua natureza multialélica, abundância relativa e boa cobertura no genoma (Powell *et al.* 1996; Varshney *et al.* 2005).

## 2.5. FILOGEOGRAFIA

A filogeografia é uma disciplina relativamente recente cujo termo foi introduzido há quase três décadas atrás por Avise *et al.* (1987). A filogeografia se refere ao estudo dos princípios e processos que regem as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente as que estão no nível intra-específico (Avise 1998). A filogeografia é como uma ponte de ligação entre os estudos dos processos microevolutivos e macroevolutivos (Bermingham & Moritz 1998). O campo de estudo da filogeografia abrange aspectos espaciais (distribuição geográfica) e temporais (relações evolutivas) e possibilita inferir como os fatores históricos influenciaram a distribuição atual da biodiversidade (Turchetto-Zolet *et al.* 2013).

A filogeografia integra dados de diferentes áreas como genética molecular, genética de populações, filogenia, demografia, etologia e geografia histórica, para interpretar e analisar as distribuições geográficas das linhagens (Avise 1998) e é uma importante abordagem para a investigação de várias questões relacionadas com a biogeografia, incluindo os papéis relativos do fluxo gênico, gargalos genéticos, expansão populacional e eventos de vicariância que moldaram os padrões geográficos da variação genética (Arbogast & Kenagy 2001).

É crescente o número de estudos filogeográficos publicados com espécies tropicais e neotropicais, porém, o número ainda permanece menor em comparação com o Hemisfério Norte (Turchetto-Zolet *et al.* 2013). Alguns trabalhos têm sido publicados sobre a filogeografia de espécies da Floresta Atlântica, tanto com plantas (e.g. Lorenz-Lemke *et al.* 2005, Ledru *et al.* 2007, Palma-Silva *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2011 e Pinheiro *et al.* 2011), como com animais (e.g. Cabanne *et al.* 2008, Batalha-Filho *et al.* 2012). A compreensão da filogeografia nesse domínio pode ajudar a entender a história

evolutiva da biota e auxiliar na identificação de áreas prioritárias para a conservação (Turchetto-Zolet *et al.* 2013).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves M, Marcucci R. 2015. Nomenclatural correction in *Cryptanthus* Otto & A. Dietrich. (Bromeliaceae - Bromelioideae). *Rodriguésia* 66 (2): 661-664.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG III). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Arbogast BS, Kenagy GJ. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28: 819-825.
- Avice JC, Arnold J, Bale RM *et al.* 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avice JC. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.
- Batalha-Filho H, Cabanne GS, Miyaki CY. 2012. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892–902.
- Baker, JG. 1889. *Handbook of the Bromeliaceae*. London: George Bell & Sons, York Street, Covent Garden.
- Bennett B. 2000. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: Benzing DH (ed.) *Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation*, cap. 14. Cambridge: Cambridge University Press. p. 587-608.
- Bermingham E, Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-369.
- Butcher D, Gouda E. 2016 [continuously updated]. The new Bromeliad Taxon list. <http://botu07.bio.uu.nl/bcg/taxonList.php>. 14.Jan.2016
- Cabanne GS, d'Horta FM, Sari HER, Santos FR, Miyaki CY. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus*

- (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760–773.
- Caddah MK, Mayer JLS, Bittrich V, Amaral MCE. 2012. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. *Botanical Journal of the Linnean Society* 168: 101–115.
- Cruz GAS. 2013. Filogenia molecular, evolução e biogeografia do gênero *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). PhD Thesis. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Duminil J, Di Michele M. 2009. Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems* 143 (3): 528-542.
- Forzza RC, Costa AF, Leme EMC *et al.* 2013. Bromeliaceae. In: Martinelli G, Moraes MA (orgs.) *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson. p. 315-396.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA *et al.* 2016a. Bromeliaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>. 14.Jan.2016.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA *et al.* 2016b. Bromeliaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5991>. 14.Jan.2016.
- Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, McGuire JA, Moritz C. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 27 (9): 480-488.
- Fundação Biodiversistas. 2005. Lista da flora brasileira ameaçada de extinção. <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/>. 01.Apr.2014.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B *et al.* 2011. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98(5): 872–895.
- Givnish TJ, Millam KC, Berry PE, Sytsma KJ. 2007. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23: 3-26.

- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM *et al.* 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequencedata. *International Journal of Plant Science* 165: S35-S54.
- Hausdorf B, Hennig C. 2010. Species Delimitation Using Dominant and Codominant Multilocus Markers. *Systematic Biology* 59: 1-13.
- Jaques-Felix H. 2000. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana* 21: 118-124.
- Ledru MP, Salatino MLF, Ceccantini G, Salatino A, Pinheiro F, Pintaud JC. 2007. Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Diversity and Distributions* 13: 761–771.
- Leme EMC. 1990. A new ornamental *Cryptanthus* from Pernambuco. *Cryptanthus Society Journal* 5: 12-13.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA. 2006. Taxonomia das bromélias dos fragmentos de mata atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: Siqueira-Filho JA, Leme EMC (eds.) *Fragmentos de mata atlântica do Nordeste – biodiversidade, conservação e suas bromélias.*, Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson Estúdio. p. 190-381.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM, Freitas LB. 2005. Phylogeographic Inferences Concerning Evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) Based on ITS (nrDNA) Variation. *Annals of Botany* 95: 799–806.
- Louzada RB, Schulte K, Wanderley MGL *et al.* 2014. Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 77: 54-64.
- Magalhães REC. 2013. Biosistemática do complexo *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Beer. MSc Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil.
- Manetti LM, Delaporte RH, Laverde Júnior A. 2009. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. *Química Nova* 32 (7): 1885-1897.
- Meudt HM, Lockhart PJ, Bryant D. 2009. Species delimitation and phylogeny of a New Zealand plant species radiation. *BMC Evolutionary Biology* 9: 1-17.

- Mez C. 1892. Bromeliaceae. In: von Martius CPF, Eichler AW, Urban I. (eds.) *Flora brasiliensis*, v.3. Leipzig , F. Fleischer. p. 172-634.
- Mez C. 1896. Bromeliaceae. In: de Candolle ALPP (ed.). *Monographie Phanerogamarum*, v. 9. Paris, Sumptibus Masson & Cia. p. 1-990.
- Mez C. 1934-1935. Bromeliaceae. In: Engler A. (ed.) *Das Pflanzenreich, Regni Vegetabilis Conspectus*, v. 4. Leipzig , Wilhem Engelmann. p. 1-667.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2008. Instrução Normativa nº 6, 23 de setembro de 2008.  
[http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom\\_boletins/\\_arquivos/83\\_19092008034949.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf)  
 f. 01.Apr. 2014.
- Oliveira-Júnior JBO. 2015. Fenologia da floração e ecologia reprodutiva da Bromeliaceae ameaçada *Cryptanthus burle-marxii* Leme e simpatria com *Cryptanthus alagoanus* Leme & J.A. MSc Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Padial JM, Miralles A, La Riva I, Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7 (16): 1-14.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- Pante E, Puillandre N, Viricel A *et al.* 2015. Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology* 24: 525–544.
- Passos VM. 2007. Delimitação específica de *Passiflora galbana* Mast. E *Passiflora mucronata* Lam. através de marcadores moleculares, dados morfométricos e citogenéticos. PhD Thesis, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brazil.
- Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science* 1 (7): 215-222.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography* 38 (10): 1923-1935.
- Ramírez-Morillo IM. 1996. Systematics, Phylogeny, and Chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). PhD Thesis, University of Missouri-St. Louis, United States.

- Ramírez-Morillo IM, Brown GK. 2001. The Origin of the Low Chromosome Number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Systematic Botany* 26 (4): 722–726.
- Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46–57
- Shao YZ, Xiang QP. 2015. Species delimitation and phylogeography of the *Abies chensiensis* complex inferred from morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 175–188.
- Schulte K, Barfuss MHJ, Zizka G. 2009. 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* 51: 327–339.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1-658.
- Smith LB, Downs RJ. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 661-1492.
- Smith LB, Downs RJ. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1493-2142.
- Souza VC, Lorenzi H. 2008. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Turchetto-Zolet AC, Segatto ALA, Turchetto C, Palma-Silva C, Freitas LB. 2013. Guia prático para estudos filogeográficos. Ribeirão Preto, Editora SBG (Sociedade Brasileira de Genética).
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology* 23 (1): 48-55.
- Versieux LM, Magalhães R, Calvente A. 2013 Extension of the *Cryptanthus* range in Northeastern Brazil with new findings in the phenotypic variation including changes in the trichomes distribution, thus enhancing the understanding of the *Cryptanthus zonatus* complex (Bromeliaceae). *Phytotaxa* 109: 54-60.

Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TS, Giulietti AM. 2007. Bromeliaceae. In: Wanderley MGL, Martins SE (coords.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, v. 5. São Paulo, FAPESP, Instituto de Botânica. p. 39-161.



## **Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in two species of *Cryptanthus***

**Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae)**

DÉBORA MARIA CAVALCANTI FERREIRA<sup>1</sup>, JORDANA NERI<sup>2</sup>, CLARISSE PALMA-SILVA<sup>3\*</sup>,  
DIEGO SOTERO PINANGÉ<sup>4</sup>, ANA MARIA BENKO-ISEPPON<sup>5</sup> & RAFAEL BATISTA LOUZADA <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, PE, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 20940-040 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biodiversidade, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, PE, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, PE, Brazil

\*E-mail address: [deboracavalcantif@hotmail.com](mailto:deboracavalcantif@hotmail.com)

## Abstract

Thirty-eight nuclear microsatellite loci originally developed for *Aechmea caudata* Lindm., *Orthophytum ophiuroides* Louzada & Wand., *Pitcairnia albiflos* Herb., *Vriesea gigantea* (Gaud.) and *Vriesea simplex* (Vell.) Beer were tested in *Cryptanthus burle-marxii* Leme and *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis.. Of the 38 loci tested, 13 were polymorphic. Ten polymorphic microsatellite loci were selected to be amplified and genotyped in one population each of *C. burle-marxii* and *C. zonatus*. The observed and expected heterozygosity per locus in the *C. burle-marxii* population ranged from 0.050 to 0.850 and 0.050 to 0.770, respectively. In *C. zonatus* the observed and expected heterozygosity per locus ranged from 0.167 to 0.846 and 0.290 to 0.692, respectively. The two populations were in Hardy-Weinberg equilibrium. However, the *Orthophytum ophiuroides* locus (Op52) for the *C. zonatus* and *Pitcairnia albiflos* locus (PaC05) for the two populations showed significant departure from HWE. These ten polymorphic loci tested will be used to assess the genetic diversity and structure of the two species of *Cryptanthus*.

**Keywords:** Bromeliad, *Cryptanthus burle-marxii*, *Cryptanthus zonatus*, transferability, microsatellite.

## Introduction

The genus *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae) comprises 78 species restricted to Brazil, where they occur in the Atlantic Forest, Caatinga and Cerrado (Forzza et al. 2016). These species belong to the Bromelioideae subfamily and are terrestrial and/or saxicolous herbs occurring from sea level to 2,000 meters of elevation (Ramírez-Morillo 1996). Traditionally *Cryptanthus* has been recognized as sister group to the genus *Orthophytum* (Ramírez-Morillo 1996) but there is recent evidence that both genera are not monophyletic (Louzada et al. 2014).

*Cryptanthus burle-marxii* Leme and *C. zonatus* (Vis.) Vis. are terrestrial plants restricted to the northern portion of the Atlantic Forest in the Brazilian Northeast region (Forzza et al. 2016). *Cryptanthus burle-marxii* is distributed in areas of coastal forest known as *restinga*, while *C. zonatus* can be found within wet forests some kilometers from the coast. *Cryptanthus zonatus* also occurs in elevated islands of wet forest surrounded by *Caatinga*, which are called *Brejos de Altitude* in Brazil (Leme and Siqueira-Filho 2006). The two species are classified as threatened, specifically as Vulnerable (VU: Vulnerable category of the IUCN) by the Livro Vermelho da Flora do Brasil (Forzza et al. 2013).

Both species are considered part of a species-complex due to the overlapping morphological characters used to separate them (Ramírez-Morillo 1996; Versieux et al. 2013). Currently, this complex harbors two accepted species since *Cryptanthus fosterianus* was synonymized under *C. zonatus* (Alves & Marcucci 2015), based on a comparison of morphological characters. A strictly morphological approach is insufficient for accurate species delimitation of *C. burle-marxii* and *C. zonatus*. To complement such an approach, molecular markers can also be used, including microsatellites (simple sequence repeats, SSRs) (Caddah et al. 2012). Microsatellites can be obtained by PCR (polymerase chain reaction) amplification using specific primers (Faleiro 2007). However, the development of specific primers is costly (Oliveira et al. 2006). Actually, a low-cost alternative is to use cross-species amplification, also known as transferability, because you will not going to develop any new microsatellite locus (Oliveira et al. 2006).

Most of the publications involving the development and cross-amplification of SSR markers in Bromeliaceae were done with species of the Tillandsioideae (Boneh et al. 2003; Palma-Silva et al. 2007; Lavor et al. 2013; Neri et al. 2015) and Pitcairnioideae subfamilies (Sarhou et al. 2003; Paggi et al. 2008; Krapp et al. 2012; Miranda et al. 2012; Wöhrmann et al. 2012, 2013; Zanella et al. 2012; Hmeljevski et al. 2013). Few studies have been developed with a focus on the species of the subfamily Bromelioideae (Goetze

et al. 2013; Krapp et al. 2013; Aoki-Gonçalves et al. 2014). For the genus *Cryptanthus*, there has been no publication reporting the development of SSR markers, only studies with cross-amplification of chloroplast microsatellite markers (Krapp et al. 2013). *Cryptanthus* species have never before been tested by cross-amplification using nuclear microsatellite markers.

Here we report the cross-amplification of nuclear microsatellite markers of *Aechmea caudata* Lindm. (Bromelioideae subfamily), *Orthophytum ophiuroides* Louzada & Wand. (Bromelioideae), *Pitcairnia albiflos* Herb. (Pitcairnioideae), *Vriesea gigantea* (Gaud.) (Tillandsioideae) and *V. simplex* (Vell.) Beer (Tillandsioideae) in two species of the genus *Cryptanthus* (*C. burle-marxii* and *C. zonatus*).

## **Materials and methods**

### **Sample collection and DNA extraction**

We sampled fresh leaves from 38 specimens (Table 1), distributed in the Atlantic Forest of northeastern Brazil (Brazilian states of Pernambuco and Rio Grande do Norte). Additionally, we stored the samples in a sodium chloride-saturated aqueous solution of cetyltrimethylammonium bromide (2%) until DNA extraction, as described by Rogstad (1992). We collected specimens belong to *C. burle-marxii* (one population of 20 individuals in addition to four specimens from selected collections in different locations) and *C. zonatus* (one population of 13 individuals and one specimen from other locality) (Table 1). We identified the specimens according to criteria of Leme and Siqueira-Filho (2006). Genomic DNA was extracted from leaves following the protocol of Doyle & Doyle (1987), with modifications described by Weising et al. (2005).

### **Cross-amplification tests of nuclear microsatellite markers**

We tested in *Cryptanthus burle-marxii* and *Cryptanthus zonatus* a total of 38 nuclear microsatellite markers previously developed for different Bromeliaceae species belonging to three subfamilies (Table 2). The 38 loci tested were originally developed by Aoki-Gonçalves et al. (2014), Goetze et al. (2013) Paggi et al. (2008), Palma-Silva et al. (2007) and Neri et al. (2015).

We performed initial cross-amplification tests using seven individuals (two individuals of *C. zonatus* and five of *C. burle-marxii*), one individual of each population (Table 1). The loci were amplified by PCR and the amplifications were carried out using a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) in 12 µL reactions containing: ~5 ng DNA template, 5 x GoTaq Master Mix (Promega Corporation), 5 pmol

forward primer, 10 pmol reverse primer, 1 pmol universal M13 primer tagged with fluorochromes (NED, FAM, VIC or PET). The forward primers contained a M13 tail with 19 base-pairs (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') at the 5' end to permit labeling with a fluorescent M13 primer during PCR amplification and genotyping.

We used the touchdown cycling program for all loci as described in detail by Palma-Silva et al. (2007). For three loci (Op 34, Op 82 and Op 87), in addition to the touchdown cycling program, we also used the standard cycling program as described in Palma-Silva et al. (2007), with the modification of an annealing temperature of 56°C. We checked the PCR products on a 1% agarose gel stained with GelRed (Biotum, Hayward, California, USA). We used the 100bp DNA ladder (Promega) as a molecular size marker. We considered the loci with successfully amplified when at least one band of the expected size was observed.

The loci that successfully amplified were genotyped. The genotyping was performed using the 3500 DNA Analyzer automated sequencer (Applied Biosystems) with a standard size GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems). We used the GeneMaker software, version 4.1 (Applied Biosystems) to determine the size range of alleles.

After of the test using seven individuals, we choose the polymorphic loci with best genotyping pattern to be amplified and genotyped in 33 individuals (20 of *C. burle-marxii* from a single population in Parque Estadual das Dunas de Natal, Voucher = *D. Cavalcanti* 757, UFP herbarium; and 13 of *C. zonatus* from a population in the RPPN Serra do Contente, Voucher = *D. Cavalcanti* 728, UFP herbarium), following the protocols described above.

### **Data analysis**

We used the Micro-Checker program version 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) to detect the presence of null alleles per locus in the two species of *Cryptanthus*. The genetic diversity per locus of the two species was described by calculating: allelic richness ( $AR$ ), number of alleles ( $A$ ), observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosity, and inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ). These calculations were done using the MSA program version 4.05 (Dieringer and Schlötterer, 2003). We tested the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) per locus using GENEPOP, version 3.5 (Raymond and Rousset 1995).

### **Results and discussion**

From the 38 loci tested, 24 presented successful amplification and were subsequently genotyped (Table 2). Of these, 13 were polymorphic (Table 2), and the 10 loci with best genotyping pattern were chosen for population analysis (Table 3).

In the *C. burle-marxii* population, the number of alleles ranged from two to seven per locus and the allelic richness varied from 1.650 to 6.126 per locus (Table 3). The observed and expected heterozygosity ranged from 0.050 to 0.850, and 0.050 to 0.770 per locus, respectively. While in the *C. zonatus* population, the number of alleles per locus and the allelic richness varied from two to five per locus (Table 3). The observed and expected heterozygosity ranged from 0.167 to 0.846, and 0.290 to 0.692 per locus, respectively (Table 3). Therefore, the estimated values for number of alleles, allelic richness and heterozygosity per locus did not have a large amplitude between the two populations of species.

The inbreeding coefficient per locus in the *C. burle-marxii* population varied from -0.198 to 0.240 while in the *C. zonatus* population varied from -0.256 to 0.483. The two populations (*C. burle-marxii* and *C. zonatus*) were shown to be in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The *Orthophytum ophiuroides* locus (Op52) in *C. zonatus* population and *Pitcairnia albiflos* locus (PaC05) of the two populations showed significant departure from HWE (Table 3). The possible presence of null alleles only was detected for *Pitcairnia albiflos* locus (PaC05) in the *C. zonatus* population. The significant departure from HWE in the PaC 05 locus in the *C. zonatus* population may have been due to the possible presence of null.

Comparing the number of alleles observed in each locus in *Cryptanthus* populations with the species for which the loci were previously developed (Goetze et al. 2013 [*A. caudata*]; Aoki-Gonçalves et al. 2014 [*O. ophiuroides*]; Paggi et al. [*P. albiflos*]; and Palma-Silva et al. 2007 [*V. gigantea*]), it can be seen that the majority of the loci (Ac01, Op30, Op69, Op77A, Op78, VgA04) in *Cryptanthus* showed less alleles than those reported by the authors who had developed the loci. Only the *Pitcairnia albiflos* locus (PaC05) presented higher number of alleles (*C. burle-marxii*: 7 alleles and *C. zonatus*: 5 alleles) than the number reported (*P. albiflos*: 3 alleles) by Paggi et al. (2008).

The genetic diversity based on expected heterozygosity ( $H_E$ ) in two populations (*Cryptanthus burle-marxii* and *C. zonatus*) was considered low to moderate compared with other bromeliad species which occur in forested areas, such as *Vriesea gigantea* Gaudich. (Palma-Silva et al. 2009) and *Bromelia antiacantha* Bertoloni (Zanella et al. 2011). And it was considered more similar to that found in some bromeliads which occur on rocky outcrops, such as *Alcantarea regina* (Vell.) Harms (Barbará et al. 2008) and *Pitcairnia staminea* Lodd. (Palma-Silva et al. 2011). However, the genetic diversity in two species was considered

higher than found in other species which occur on rocky outcrops, such as *Alcantarea geniculata* (Wawra) J.R. Grant (Barbará et al. 2007), *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms (Barbará et al. 2007), *Alcantarea glaziouana* (Leme) J.R. Grant (Barbará et al. 2008) and *Pitcairnia albiflos* Herb (Palma-Silva et al. 2011).

The cross-amplification was moderate in both species *Cryptanthus*, about 64% of the loci tested were amplified and about 35% of the loci tested were polymorphic. The cross-amplification in three subfamilies tested, confirms that the loci can be transferred between the different species from different subfamilies of Bromeliaceae (Palma-Silva et al. 2007; Paggi et al. 2008; Krapp et al. 2012; Zanella et al. 2012; Goetze et al. 2013; Lavor et al. 2013; Aoki-Gonçalves et al. 2014; Neri et al. 2015).

The 10 polymorphic loci transferred to *C. burle-marxii* and *C. zonatus* will be used to assess the genetic diversity and structure of natural populations of these species. Such studies are expected to give some insight into the history of the populations and processes involved in the population divergence. With the data on genetic structure, we will analyze the gene flow between populations of *C. burle-marxii* and *C. zonatus* and test the hypothesis that *C. burle-marxii* and *C. zonatus* are, in fact, the same species.

## Acknowledgements

This paper is part of the first author Master thesis conducted in the Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) from Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). The first author thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for her M.Sc. scholarship and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). The authors thank the Projeto Universal, funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (449686/2014-0) and the Atlantic Forest Project, funded by CNPq, NSF (DEB-0946618), Velux Stiftung and Beneficia Foundation. The authors also thank the CEIS Laboratory of the Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Rio Claro, for sample genotyping.

## References

Alves M, Marcucci R (2015) Nomenclatural correction in *Cryptanthus* Otto & A. Dietrich. (Bromeliaceae - Bromelioideae). *Rodriguésia* 66 (2): 661-664. doi: 10.1590/2175-7860201566229

- Aoki-Gonçalves F, Louzada RB, Souza LM, Palma-Silva C (2014) Microsatellite Loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) Species Adapted to Neotropical Rock Outcrops. *Appl Plant Sci* 2 (3): 1–4. doi:10.3732/apps.1300073
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to Neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata*. *Mol Ecol Resour* 16: 1981–1992. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03272.x
- Barbará T, Lexer C, Martinelli G, Mayo S, Fay MF, Heuertz M (2008) Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity* 101: 285–296. doi:10.1038/hdy.2008.65
- Boneh L, Kuperus P, Tienderen HV (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
- Caddah MK, Mayer JLS, Bittrich V, Amaral MCE (2012) Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. *Bot J Linn Soc* 168: 101–115. doi: 10.1111/j.1095-8339.2011.01192.x
- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molec Ecol Notes* 3: 167–169. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00351.x
- Doyle JA, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf 526 tissue. *Phytochem Bull* 19: 11–15.
- Faleiro, FG (2007) Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Embrapa, Planaltina, Distrito Federal.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira-Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L (2016) Bromeliaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5991>. Accessed 10 Nov 2015
- Forzza RC, Costa AF, Leme EMC, Versieux LM, Wanderley MGL, Louzada RB, Monteiro RF, Judice DM, Fernandez EP, Borges RAX, Penedo TSA, Monteiro NP, Moraes MA (2013) Bromeliaceae. In: Martinelli G, Moraes MA (orgs.) Livro Vermelho da Flora do Brasil. Andrea Jakobsson, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp 315-396

- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C (2013). Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochem Syst Ecol* 48: 194-198. doi:10.1016/j.bse.2012.12.022
- Hmeljevski KV, Ciampi MB, Baldauf C, Reis MS, Forzza RC (2013) Development of SSR Markers for *Encholirium horridum* (Bromeliaceae) and Transferability to Other Pitcairnioideae. *Appl Plant Sci* 1(4): 1-4. doi: 10.3732/apps.1200445
- Krapp F, Wöhrmann T, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K (2012) A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. *Am J Bot*: 470-473. doi: 10.3732/ajb.1200153
- Krapp F, Cruz GAS, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Weising K (2013) A set of variable plastid SSR markers for the genus *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Res Plant Biol* 3(2): 18-21.
- Lavor P, van den Berg C, Versieux LM (2013) Transferability of 10 nuclear microsatellite primers to *Vriesea minarum* (Bromeliaceae), a narrowly endemic and threatened species from Brazil. *Braz J Bot* 36(2): 165-168. doi: 10.1007/s40415-013-0012-7
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA (2006) Taxonomia das bromélias dos fragmentos de mata atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: Siqueira-Filho JA, Leme EMC (eds.) Fragmentos de mata atlântica do Nordeste – biodiversidade, conservação e suas bromélias. Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro, pp 190-381
- Louzada RB, Schulte K, Wanderley MGL, Silvestro D, Zizka G, Barfuss MHJ, Palma-Silva C (2014) Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. *Mol Phylogenet Evol*. 77: 54-64. doi: 10.1016/j.ympev.2014.03.007
- Miranda FD, Gontijo ABPL, Santilano FC, Favoreto FC, Soares TCB (2012) Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae. *Biota Neotrop* 12 (3): 319-323.

- Neri J, Nazareno AG, Wendt T, Palma-Silva C (2015) Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae. *Biochem Syst Ecol* 58: 34-37. doi:10.1016/j.bse.2014.10.004
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29 (2): 294-307. doi: 10.1590/S1415-47572006000200018
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Resour.* 8: 980-982. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02126.x.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Mol Ecol Notes.* 7: 654-657. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01665.x
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi, GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512. doi: 10.1038/hdy.2009.116.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Mol Ecol Resour* 20: 3185–3201. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05143.x.
- Ramírez-Morillo IM (1996) Systematics, Phylogeny, and Chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). Ph.D. dissertation, University of Missouri-St. Louis.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
- Rogstad SH (1992) Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon* 41: 701-708.
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdière 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
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molec Ecol Notes* 4: 535-538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Versieux LM, Magalhães R, Calvente A (2013) Extension of the *Cryptanthus* range in Northeastern Brazil with new findings in the phenotypic variation including changes in the trichome's distribution, thus enhancing the understanding of the *Cryptanthus zonatus* complex (Bromeliaceae). *Phytotaxa* 109 (1): 54–60. doi: 10.11646/phytotaxa.109.1.6
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G (2005) DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, Singapore.
- Wöhrmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, 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. *Amer J Bot*: e160–e163. doi: 10.3732/ajb.1100470
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Amer J Bot* 98 (9): 1511–1519. doi:10.3732/ajb.1000458
- Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis MS, Bered F (2012) Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads. *Int J Mol Sci* 13 (12): 15859-15866. doi: 10.3390/ijms131215859

## Tables

**Table 1** - Location of the sampled populations and number of individuals collected of *Cryptanthus burle-marxii* and *Cryptanthus zonatus*.

| Species                | State | Municipality | Location                                   | Latitude S | Longitude W | N  |
|------------------------|-------|--------------|--------------------------------------------|------------|-------------|----|
| <i>C. burle-marxii</i> | RN    | Natal        | Parque Estadual das Dunas de Natal         | 05°51'39"  | 35°11'05"   | 20 |
| <i>C. burle-marxii</i> | RN    | Baía Formosa | RPPN Mata Estrela                          | 06°22'40"  | 35°01'22"   | 1  |
| <i>C. burle-marxii</i> | PE    | Paulista     | Estação Ecológica de Caetés                | 07°55'15"  | 34°55'15"   | 1  |
| <i>C. burle-marxii</i> | PE    | Ipojuca      | Mata do Cupe                               | 08°26'58"  | 34°59'33"   | 1  |
| <i>C. burle-marxii</i> | PE    | Ipojuca      | RPPN Nossa Senhora do Outeiro de Maracaípe | 08°31'48"  | 35°01'05"   | 1  |
| <i>C. zonatus</i>      | PE    | Igarassu     | Usina São José                             | 07°50'18"  | 34°59'57"   | 1  |
| <i>C. zonatus</i>      | PE    | Gravatá      | RPPN Serra do Contente                     | 08°13'48"  | 35°35'10"   | 13 |

Rio Grande do Norte (RN), Pernambuco (PE).

**Table 2-** Cross-amplification of 38 nuclear microsatellite markers previously developed for different Bromeliaceae species in *Cryptanthus burle-marxii* and *Cryptanthus zonatus*.

| Locus | Species                        | Subfamily       | Amplification | Polymorphic    |
|-------|--------------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| Ac01  | <i>Aechmea caudata</i>         | Bromelioideae   | +             | +              |
| Ac11  | <i>Aechmea caudata</i>         | Bromelioideae   | +             | -              |
| Ac25  | <i>Aechmea caudata</i>         | Bromelioideae   | +             | -              |
| Ac55  | <i>Aechmea caudata</i>         | Bromelioideae   | -             |                |
| Ac78  | <i>Aechmea caudata</i>         | Bromelioideae   | +             | -              |
| Op08  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op13  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | -              |
| Op17  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op18  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op25  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op28  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op30  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op34* | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | - <sup>a</sup> |
| Op45  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op49  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op52  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op53  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op63  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op69  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op73  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op77A | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op77B | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | -             |                |
| Op78  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op82* | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | - <sup>a</sup> |
| Op87* | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | + <sup>b</sup> |
| Op92  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | +              |
| Op93  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | - <sup>a</sup> |
| Op95  | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromelioideae   | +             | - <sup>a</sup> |
| PaC05 | <i>Pitcairnia albiflos</i>     | Pitcairnioideae | +             | +              |
| PaD07 | <i>Pitcairnia albiflos</i>     | Pitcairnioideae | +             | - <sup>a</sup> |
| PaZ01 | <i>Pitcairnia albiflos</i>     | Pitcairnioideae | -             |                |
| VgA04 | <i>Vriesea gigantea</i>        | Tillandsioideae | +             | +              |
| VgC01 | <i>Vriesea gigantea</i>        | Tillandsioideae | +             | +              |
| VgF02 | <i>Vriesea gigantea</i>        | Tillandsioideae | -             |                |
| Vs1   | <i>Vriesea simplex</i>         | Tillandsioideae | +             | - <sup>a</sup> |
| Vs8   | <i>Vriesea simplex</i>         | Tillandsioideae | +             | - <sup>a</sup> |
| Vs9   | <i>Vriesea simplex</i>         | Tillandsioideae | -             |                |
| Vs10  | <i>Vriesea simplex</i>         | Tillandsioideae | -             |                |

\* = touchdown cycling program and standard cycling program were used; 'a' = pattern of genotyping unanalysable; 'b' = pattern of genotyping unanalysable with touchdown cycling program and polymorphic with standard cycling program.

**Table 3-** Genetic diversity estimate to ten polymorphic loci of nuclear microsatellite transferred to *Cryptanthus burle-marxii* and *Cryptanthus zonatus*.

| Locus | <i>Cryptanthus burle-marxii</i> (n=20) |   |       |       |                |                 | <i>Cryptanthus zonatus</i> (n=13) |   |    |       |                |                 |
|-------|----------------------------------------|---|-------|-------|----------------|-----------------|-----------------------------------|---|----|-------|----------------|-----------------|
|       | Size range (pb)                        | A | AR    | Ho    | H <sub>E</sub> | F <sub>IS</sub> | Size range (pb)                   | A | AR | Ho    | H <sub>E</sub> | F <sub>IS</sub> |
| Ac01  | 283-285                                | 2 | 1.883 | 0.100 | 0.097          | -0.040          | 285-287                           | 2 | 2  | 0.385 | 0.409          | 0.042           |
| Op17  | 173-177                                | 3 | 2.993 | 0.450 | 0.476          | 0.042           | 173-175                           | 2 | 2  | 0.167 | 0.290          | 0.418           |
| Op25  | 171-175                                | 3 | 2.993 | 0.450 | 0.476          | 0.042           | 171-173                           | 2 | 2  | 0.167 | 0.290          | 0.418           |
| Op30  | 132-138                                | 3 | 3     | 0.778 | 0.660          | -0.198          | 132-140                           | 3 | 3  | 0.846 | 0.692          | -0.253          |
| Op52  | 265-267                                | 2 | 1.836 | 0.200 | 0.185          | -0.099          | 245-273                           | 3 | 3  | 0.714 | 0.648          | -0.150*         |
| Op69  | 114-134                                | 7 | 5.449 | 0.850 | 0.728          | -0.185          | 122-132                           | 4 | 4  | 0.818 | 0.671          | -0.256          |
| Op77A | 159-161                                | 2 | 1.650 | 0.050 | 0.050          | -0.013          | 159-161                           | 2 | 2  | 0.462 | 0.443          | -0.064          |
| Op78  | 221-233                                | 5 | 4.960 | 0.750 | 0.756          | -0.004          | 227-233                           | 3 | 3  | 0.462 | 0.588          | 0.202           |
| PaC05 | 185-207                                | 7 | 6.126 | 0.579 | 0.770          | 0.240*          | 165-195                           | 5 | 5  | 0.333 | 0.652          | 0.483*          |
| VgA04 | 175-177                                | 2 | 1.989 | 0.200 | 0.185          | -0.099          | 175-177                           | 2 | 2  | 0.231 | 0.409          | 0.430           |

\*Significant departure from HWE ( $P < 0.05$ ). Number of alleles (A), allelic richness (AR), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (H<sub>E</sub>), inbreeding coefficient (F<sub>IS</sub>).



---

**CAPÍTULO II – A ser submetido ao periódico Botanical Journal of the Linnean Society**

**Título: Delimitação de espécies e filogeografia do complexo *Cryptanthus zonatus* (Vis.)  
Vis. (Bromeliaceae)**

Autores: Débora Maria Cavalcanti Ferreira<sup>1</sup>, Clarisse Palma-Silva<sup>2\*</sup>, Jordana Néri<sup>3</sup>, Maria Cláudia Melo Pacheco de Medeiros<sup>4</sup>, Diego Sotero Pinangé<sup>4</sup> & Rafael Batista Louzada<sup>4</sup>

Instituições:

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, PE, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biodiversidade, Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 20940-040 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, PE, Brazil

\*Autora para correspondência: clarissepalma@yahoo.com.br

Título corrido: Delimitação de espécies e filogeografia do complexo *Cryptanthus zonatus*

## RESUMO

*Cryptanthus burle-marxii* e *Cryptanthus zonatus* são duas espécies restritas ao norte da Floresta Atlântica brasileira e não apresentam delimitação taxonômica bem definida devido à sobreposição de caracteres morfológicos. Ambas as espécies compõem o complexo *Cryptanthus zonatus*. O presente estudo utilizou dados de morfologia e de genética de populações, onde dez locos de microssatélites nucleares foram genotipados em oito populações do complexo *C. zonatus*, para delimitar as duas espécies. Além disso, análises filogeográficas utilizando dados moleculares e de modelagem de nicho ecológico, foram realizadas para inferir como as mudanças climáticas do quaternário modificaram a distribuição geográfica e estrutura genética das populações deste complexo. Os resultados indicam que *C. burle-marxii* e *C. zonatus* são dois nomes dados à mesma espécie. A análise filogeográfica mostra que na última glaciação a distribuição geográfica potencial do complexo era contínua e maior em algumas áreas localizadas ao sul, onde atualmente é mar, o que deve ter ocorrido provavelmente devido à regressão marinha neste local. No Holoceno médio houve uma potencial separação da distribuição que perdurou até o presente formando dois grupos geneticamente diferenciados, um ao norte e outro ao sul. Para a conservação da espécie foram indicadas populações prioritárias para o estabelecimento de unidades de conservação.

Palavras-chave: Brasil – bromélias – *Cryptanthus burle-marxii* – diversidade genética – estrutura genética – Floresta Atlântica – genética de populações – microssatélites – modelagem de nicho ecológico – quaternário.

## INTRODUÇÃO

A delimitação de espécies é de grande importância já que espécies são unidades biológicas fundamentais (Hausdorf & Henning, 2010). Espécies são consideradas hipóteses que podem ser corroboradas ou refutadas com a aquisição de novas evidências (Pante *et al.*, 2015). Neste contexto surge a taxonomia integrativa, uma abordagem que usa diferentes atributos biológicos (morfologia, DNA, distribuição geográfica, habitat ou comportamento) que são analisados através de variados métodos para propor e/ou testar hipóteses de espécies (Pante *et al.*, 2015) de modo a reduzir a subjetividade e delimitar espécies de forma mais estável e transparente, estabilizando as inferências taxonômicas (Fujita *et al.*, 2012).

Nas últimas duas décadas, o uso de marcadores moleculares como ferramentas para a delimitação espécies têm aumentado (Duminil & Di Michele, 2009), e uma abordagem em genética de populações tem sido utilizada para a delimitação de espécies (e.g. Caddah *et al.*, 2015; Shao & Xiang, 2015). O estudo da genética de populações permite inferir os processos evolutivos responsáveis pela formação e manutenção das espécies. A *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) afirma que “o objetivo de conservação é a manutenção da diversidade genética e das populações viáveis de todos os táxons na natureza, de modo a manter as interações biológicas, e os processos e funções ecológicas” (IUCN, 2002). A manutenção da diversidade genética em uma espécie é vital para a sua adaptação às mudanças ambientais, tais como as mudanças climáticas, doenças, perda de habitat e/ou fragmentação (Kramer & Havens, 2009; Miao *et al.*, 2015).

As inferências dos processos evolutivos baseadas nos eventos históricos e demográficos que moldaram a atual estrutura genética e distribuição dos organismos é o campo de estudo da filogeografia (Buckley, 2009). Para a Floresta Atlântica brasileira alguns estudos de filogeografia foram desenvolvidos com plantas, tais como os estudos de Lorenz-Lemke *et al.* (2005), Ledru *et al.* (2007), Palma-Silva *et al.* (2009), Ribeiro *et al.* (2011), Pinheiro *et al.* (2011) e Pinheiro *et al.* (2013) que abordam como a distribuição geográfica das espécies foi modificada pelas oscilações climáticas do quaternário.

O gênero *Cryptanthus* Otto & A.Dietr. apresenta 78 espécies aceitas, restritas a região nordeste e sudeste do Brasil ocorrendo nos domínios fitogeográficos da Floresta Atlântica, Caatinga e Cerrado (Ramírez-Morillo, 1996; Forzza *et al.*, 2016). Dentre as

espécies do gênero, duas espécies que são morfologicamente relacionadas (*Cryptanthus burle-marxii* Leme e *Cryptanthus zonatus* (Vis.) Vis.) são ervas terrícolas, esciófilas (Leme & Siqueira-Filho, 2006), restritas ao norte da Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil (Forzza *et al.*, 2015), e não apresentam delimitação taxonômica bem definida devido a sobreposição de seus caracteres morfológicos (Ramírez-Morillo, 1996; Versieux *et al.*, 2013).

Ambas as espécies compõem o complexo *Cryptanthus zonatus* (Ramírez-Morillo, 1996, Versieux *et al.*, 2013). Anteriormente, *Cryptanthus fosterianus* L.B. Smith. também era considerada uma espécie do complexo *C. zonatus* (Ramírez-Morillo, 1996; Versieux *et al.*, 2013) e era apontada como possivelmente extinta na natureza (MMA, 2008; Forzza *et al.*, 2013). Porém, recentemente, Alves & Marcucci (2015), sinonimizaram *C. fosterianus* à *C. zonatus* baseado na comparação de caracteres morfológicos. Alguns estudos já tem enfatizado a importância de trabalhos de campo (Ramírez-Morillo, 1996) e de genética de populações (Versieux *et al.*, 2013) para a resolução taxonômica das espécies do complexo.

*Cryptanthus burle-marxii* e *C. zonatus* estão presentes em listas de espécies ameaçadas, *C. burle-marxii* é considerada como Vulnerável pela Fundação Biodiversitas (2005) e pelo Livro Vermelho da Flora do Brasil (Forzza *et al.*, 2013), enquanto que *C. zonatus* é classificado como criticamente em perigo pela Fundação Biodiversitas (2005) e como vulnerável pelo Livro Vermelho da Flora do Brasil (Forzza *et al.*, 2013). *Cryptanthus burle-marxii* é considerada vulnerável pela mais recente lista (Forzza *et al.*, 2013) devido a sua restrita extensão de ocorrência (11.276,51 km<sup>2</sup>) e baixo número de subpopulações conhecidas (menos de 10 localidades). A fragmentação e a perda de hábitat ao longo de sua distribuição representa uma ameaça para a sobrevivência da espécie na natureza. *Cryptanthus zonatus* também é considerada vulnerável por Forzza *et al.* (2013) devido a sua distribuição restrita (extensão de ocorrência=18.612,36 km<sup>2</sup>) e por está sujeita ao declínio contínuo da qualidade do hábitat. A espécie está sujeita às extinções locais de subpopulações devido à coleta de indivíduos maduros para fins comerciais (Forzza *et al.*, 2013).

*Cryptanthus burle-marxii* é uma espécie considerada andromonóica parcial, pois apresentam uma separação temporal da abertura das flores masculinas e hermafroditas (Oliveira-Júnior, 2015). Primeiro são produzidas flores masculinas e na metade final da floração são produzidas flores hermafroditas no mesmo indivíduo (Oliveira-Júnior, 2015).

As flores de *C. burle-marxii* têm características mistas de polinização, tem néctar próprio de ornitofilia e morfologia de melitofilia (há evidência de presença de osmóforos pelo teste de pigmentação com vermelho neutro que podem explicar o comportamento das abelhas de raspar as pétalas evidenciando biologicamente a presença de odores florais) (Oliveira-Júnior, 2015). *Phaetornis ruber* (beija-flor) e *Eulaema nigrita* (abelha) são os polinizadores mais frequentes (Oliveira-Júnior, 2015). Para *C. zonatus* a biologia reprodutiva não é conhecida.

As duas espécies são diferenciadas por caracteres vegetativos e reprodutivos (Leme, 1990, Leme & Siqueira-Filho, 2006). No protólogo de *Cryptanthus burle-marxii* (Leme, 1990) e no estudo de Leme & Siqueira-Filho (2006), esta espécie é diferenciada de *C. zonatus* pela propagação vegetativa (rizomas vs. gemas axilares), tamanho das folhas (8-20 x 2-4 cm vs. 20-40 x 4-5 cm), comprimento das sépalas (13 mm vs. 15-19 mm) e conação das pétalas (1/3 conadas vs. 1/2 conadas), respectivamente. Além dessas características, Leme & Siqueira-Filho (2006) diferenciam *C. burle-marxii* de *C. zonatus* pelo número de flores nos fascículos basais (cerca de 2 vs. cerca de 4) e comprimento das flores (35-40 mm vs. 39-45 mm). Ramírez-Morillo (1996), na chave de identificação para o gênero *Cryptanthus*, separa *C. burle-marxii* de *C. zonatus* pelo comprimento das sépalas (35 mm vs. 19 mm) e pela correlação entre o comprimento das brácteas florais e comprimento das sépalas (brácteas com metade do comprimento das sépalas vs. bráctea com o mesmo tamanho das sépalas). A autora ainda indica que os caracteres de reprodução vegetativa não são recomendados como caracteres diagnósticos.

Diante do exposto, o presente estudo reuniu dados de morfologia, diversidade e estrutura genética das populações usando marcadores microssatélites nucleares, e modelagem de nicho ecológico do complexo *Cryptanthus zonatus*, com o objetivo de responder as seguintes questões: 1) *Cryptanthus burle-marxii* e *C. zonatus* são dois nomes atribuídos à mesma espécie? 2) Como as mudanças climáticas do quaternário modificaram a distribuição geográfica e a estrutura genética do complexo *Cryptanthus zonatus*? 3) Quais são as implicações do estudo integrativo para a conservação do complexo *Cryptanthus zonatus*?

## MATERIAIS E MÉTODOS

## POPULAÇÕES AMOSTRADAS E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Um total de 147 indivíduos pertencentes a oito populações de *Cryptanthus burle-marxii* e *Cryptanthus zonatus* foram amostradas em áreas localizadas no domínio da Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil (nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte) (Fig. 1 e Fig. 2). Para cada população, uma média de 18.3 indivíduos (variando de 12-21) foram amostrados. Os indivíduos das populações do complexo ocorrem agrupados, o que dificulta a amostragem de diferentes indivíduos. Para evitar a coleta de indivíduos aparentados, foram coletados indivíduos distantes, porém, muitas populações tinham tamanho pequeno com indivíduos ocorrendo próximos um dos outros (>1 metro de distância). As abreviações, os estados, os municípios, as localidades e as coordenadas geográficas das populações amostradas estão mostradas na Tabela 1. A distância geográfica entre as populações variou de 10 a 270 km.

Para a identificação das espécies foi coletada uma amostra de um indivíduo por população, exceto para as populações com poucos espécimes (Tabela 1). As amostras foram processadas e depositadas no herbário Geraldo Mariz (UFP). Os espécimes foram identificados utilizando os caracteres diagnósticos indicados por Leme & Siqueira-Filho (2006), mostrados na Tabela 2. Para cada indivíduo, folhas jovens foram coletadas e armazenadas em solução aquosa saturada de cloreto de sódio com 2% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), como descrita por Rogstad (1992) colocadas no freezer até a extração do DNA.

## EXTRAÇÃO DO DNA, AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM

O DNA genômico foi extraído das folhas seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com modificações descritas por Weising *et al.* (2005). Após a extração, o DNA foi quantificado usando o equipamento BioPhotometer plus (epENDORF) e a sua qualidade foi analisada em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotum, Hayward, California, USA).

Dez locos de marcadores microsatélites nucleares previamente desenvolvidos para as espécies *Aechmea caudata* Lindm. (desenvolvido por Goetze *et al.* 2013-lócus: Ac01), *Orthophytum ophiuroides* Louzada & Wand. (Aoki-Gonçalves *et al.* 2014-locos: Op17, Op25, Op30, Op52, Op69, Op77A and Op78), *Pitcairnia albiflos* Herb. (Paggi *et al.* 2008 - lócus: PaC05) e *Vriesea gigantea* (Gaud.) (Palma-Silva *et al.* 2007-lócus: VgA 04), foram

utilizados neste estudo. Os locos foram previamente testados por amplificação heteróloga nas espécies *C. burle-marxii* e *C. zonatus* por Ferreira *et al.* (Cap. 1).

As amplificações por PCR (*polymerase chain reaction*) foram feitas usando um termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems) em reações descritas por Ferreira *et al.* (Cap. 1). Os dez locos de microssatélites nucleares foram amplificados através de PCR usando o programa de ciclo “touchdown” descrito em detalhes em Palma-Silva *et al.* (2007). Os produtos da PCR foram checados em gel de agarose 1% corado com GelRed e genotipados em sequenciador automático 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems) com tamanho padrão 500 LIZ GeneScan (Applied Biosystems). Os tamanhos dos alelos em pares de base foram determinados usando o software GeneMarker version 4.1 (Applied Biosystems).

## ANÁLISE DOS DADOS

### *Diversidade genética*

O número total de clones em cada população foi detectado através do software GIMLET versão 1.3.3 (Valière, 2002). O software MICRO-CHECKER versão 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) foi utilizado para detectar a possível presença de alelos nulos. A diversidade genética das populações e dos locos foi descrita através dos cálculos de número de alelos ( $A$ ), riqueza alélica ( $AR$ ), variância no tamanho do alelo ( $Var$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), usando o programa MSA (Dieringer & Schlötterer, 2003). O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foi calculado no programa FSTAT (Goudet, 1995) e o coeficiente total de endogamia ( $F_{IT}$ ), índice de fixação ( $F_{ST}$ ) e número de alelos privados ( $PA$ ) foram analisados no programa GENEALEX. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi testado usando o GENEPOP versão 3.5 (Raymond & Rousset, 1995).

### *Análise de recentes reduções no tamanho efetivo populacional*

Para analisar a possibilidade de recentes reduções dos tamanhos efetivos populacionais (e. g. gargalos genéticos) foram realizadas análises no programa BOTTLENECK (Piry *et al.*, 1999), usando o teste *Wilcoxon sign-rank*. As análises foram feitas baseadas no modelo *two phased mutation model* (TPM).

### *Análise bayesiana de estrutura genética*

A análise bayesiana foi feita no programa `STRUCTURE` versão 2.3.3 (Hubisz *et al.*, 2009) para atribuir os indivíduos a grupos genéticos ( $K$ ) e para estimar as proporções de mistura ( $Q$ ) para cada indivíduo. As análises foram realizadas sob o modelo de mistura assumindo frequências alélicas independentes e usando um período de *burn-in* de 500.000, *run lengths* de 1.000.000 e 10 interações por  $K$ , que variou de 1 a 9 para confirmar a estabilização das estatísticas. O método proposto por Evanno *et al.* (2005) foi empregado para determinar o número de agrupamentos mais provável ( $K$ ) presentes nos dados.

### *Distância genética*

Uma árvore neighbour-joining (NJ) não enraizada foi construída para descrever as relações entre as populações em uma forma gráfica. A árvore de distância foi construída de acordo com Cavalli-Sforza & Edwards (1967). O programa `MSA` (Dieringer & Schlötterer, 2003) foi usado para se obter 1.000 réplicas de bootstrap de matriz de distância, que foram então analisadas no programa `PHYLIP` 3.6 (Felsenstein, 2004) para gerar a árvore NJ.

### *Diferenciação genética*

A análise de variância molecular (`AMOVA`) foi feita usando o programa `ARLEQUIN` versão 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) para avaliar a partição da diversidade genética em três diferentes níveis hierárquicos: entre grupos, entre populações dentro dos grupos e dentro das populações. Os grupos foram definidos baseados nos dados obtidos no programa `STRUCTURE` usando o número de agrupamentos mais provável ( $K$ ) do método de Evanno *et al.* (2005).

### *Tamanhos efetivos populacionais e taxas de migração*

A análise do valor de Theta e o número efetivo de migrantes ( $N_e m$ ) entre os pares de populações foram estimadas seguindo a teoria de coalescência e abordagem baseada em máxima verossimilhança usando `MIGRATE` versão 2.0.6 (Beerli & Felsenstein, 1999), como descrito por Barbará *et al.* (2007). O tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) foi calculado usando a fórmula  $N_e = \text{Theta}/4\mu$  ( $\mu$  = taxa de mutação). O valor da taxa de mutação utilizado foi de  $10^{-3}$  por gameta por geração (Zhang & Hewitt, 2003).

### *Modelagem de nicho ecológico*

Para a modelagem de nicho ecológico foram utilizados 12 pontos de ocorrência do complexo *Cryptanthus zonatus* (oito pontos referentes às populações coletadas e 4 pontos obtidos da análise de material incorporado no herbário UFP). Os modelos de distribuição

do complexo *Cryptanthus zonatus* foram obtidos utilizando a abordagem Bioclim, implementada no programa DIVA-GIS versão 7.5 (Hijmans *et al.*, 2012). As camadas ambientais consistiram de 19 variáveis climáticas baixadas a partir do conjunto de dados do Worldclim (Hijmans *et al.*, 2005). Para minimizar a redundância entre as camadas, foram utilizadas as camadas não fortemente correlacionadas (correlação de Pearson  $< 0,85$ ) que foram consideradas determinantes para a ocorrência da espécie. Os modelos finais apresentaram seis variáveis climáticas com resolução espacial de 5 km<sup>2</sup> (2,5'): oscilação térmica anual-BIO7; temperatura média da estação úmida-BIO8; temperatura média da estação seca-BIO9; precipitação do mês mais úmido-BIO13; precipitação do mês mais seco-BIO14; e sazonalidade de precipitação (coeficiente de variação)-BIO15. Os dados ambientais abrangem três diferentes períodos de tempo, um do período presente e dois do período passado: o holoceno médio (HM: ~ 6.000 ma) e o último máximo glacial (UMG: ~ 22.000 ma), que foram baseados nos modelos *General Circulation Models* (GCM) e *Community Climate System Model* (CCSM4). Os modelos foram avaliados segundo *Area Under the Curve* (AUC).

## RESULTADOS

### IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS

Nos espécimes analisados das populações amostradas foram observados caracteres diagnósticos de *Cryptanthus burle-marxii* e de *Cryptanthus zonatus* (Tabela 3). Todas as populações apresentaram propagação vegetativa por rizomas que é uma característica de *C. burle-marxii*, exceto a população SCO-PE que apresenta a propagação vegetativa por gemas axilares e seria identificada como *C. zonatus*. Pelo comprimento das folhas todas as populações pertenceriam à *C. zonatus* exceto a população MIC-PB que apresenta folha com 15-20 cm de comprimento e pertenceria a *C. burle-marxii*. Pela dificuldade de distinguir as espécies com base nas características morfológicas foi optado *a priori* tratar todas as populações como uma única espécie nas análises de estrutura genética.

### DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS

Dos 147 espécimes amostrados, 41 foram detectados como clones e foram removidos das análises (Tabela 4). A riqueza alélica ( $AR$ ) nas populações do complexo *Cryptanthus zonatus* variou de 1,500 a 3,200 com média de 2,420, enquanto que a variância no tamanho do alelo ( $Var$ ) foi de 1,760 a 31,390 com média de 11,127. Todas as populações apresentaram alelos privados ( $PA$ ), exceto a população da EEC-PE (Tabela 4). A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) variou de 0,400 a 0,823 e de 0,258 a 0,543, respectivamente. O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foi baixo em todas as populações. Cinco populações (MES-RN, MIC-PB, MOM-PE, USJ-PE e SCO-PE) não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ) e em quatro delas (MES-RN, MIC-PB, USJ-PE e SCO-PE) sofreram gargalos genéticos.

#### DIVERSIDADE GENÉTICA DOS LOCOS DE MICROSSATÉLITES NUCLEARES

Todos os 10 locos de microsatélites nucleares analisados foram polimórficos (Tabela 5). A possível presença de alelos nulos não pode ser excluída para os locos Ac01, Op52, Op69 e PaC05. O número de alelos por locos variou de três a 17, com média igual a 7,100, enquanto que a riqueza alélica ( $AR$ ) variou de 1,690 a 6,440 e teve média igual a 3,600. A heterozigosidade observada e esperada variou de 0,215 a 0,683 e 0,153 a 0,699, respectivamente (Tabela 5). O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foi baixo em todos os locos e os locos Ac01, Op30, Op52, Op69 e PaC05 não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ).

#### ANÁLISE BAYESIANA DE ESTRUTURA GENÉTICA

O método proposto por Evanno et al. (2005) identificou o  $K=2$  como sendo o melhor número de agrupamentos presente nos dados (Fig. 3). A análise do STRUCTURE com o  $K=2$  com as proporções de mistura ( $Q$ ) para cada indivíduo das populações do complexo *Cryptanthus zonatus* é mostrada na Figura 4. Quase todos os indivíduos das três populações localizadas mais ao norte (PED-RN, MES-RN e MIC-PB) mostraram proporções de mistura associadas ao agrupamento I e as populações mais ao sul (MCU-PE, MOM-PE, CEE-PE, USJ-PE e SCO-PE) mostraram proporções de mistura associadas ao agrupamento II (Fig. 4). Além disso, houve mistura entre as populações que ocorrem em

áreas de Restinga do agrupamento I (PED-RN, MES-RN e MIC-PB) com o agrupamento II (MCU-PE e MOM-PE).

## DISTÂNCIA E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA

Na análise de distância genética através do método de *Neighbor-Joining* dois agrupamentos emergem (Fig. 5), um com as populações mais ao norte (PED-RN, MES-RN e MIC-PB) e o outro com as populações que estão ao sul (MCU-PE, MOM-PE, EEC-PE, USJ-PE e SCO-PE), corroborando com os dados encontrados na análise do *STRUCTURE*.

A *AMOVA* mostrou que há uma pequena variação genética “entre grupos” (5%), ou seja, entre os dois agrupamentos norte e sul das populações do complexo *Cryptanthus zonatus* (Tabela 6). No nível hierárquico “entre populações dentro dos grupos” a variação genética foi de 21%. E a variação genética encontrada “dentro das populações” foi de 72% (Tabela 6). A diferenciação genética é maior dentro das populações ( $F_{ST} = 0,272$ ) do que entre populações dentro dos grupos ( $F_{SC} = 0,230$ ) e do que entre os grupos ( $F_{CT} = 0,054$ ).

## TAMANHO EFETIVO POPULACIONAL E TAXAS DE MIGRAÇÃO

O tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) foi menor na população da EEC-PE e maior na população MOM-PE (Tabela 7). Todas as populações apresentaram baixo número efetivo de migrantes ( $N_e m$ ) entre os pares de populações com  $<1$  migrante por geração, com exceção da população da MES-RN para a população PED-RN que o número efetivo de migrantes foi 1,033 (Tabela 7).

## MODELAGEM DE NICHOS ECOLÓGICO

Os três modelos apresentaram valores altos de AUC ( $>0,95$ ). A estimativa da área potencial de distribuição do complexo *Cryptanthus zonatus* (Fig. 6) mostrou que no Último Máximo Glacial (UMG) havia um contínuo de distribuição (Fig. 6a), diferente do que é visto para os cenários potenciais inferidos para o Holoceno médio (Fig. 6b) e presente que apresentam uma disjunção entre as populações do norte e sul (Fig. 6c). Além disso, a distribuição do complexo no UMG era maior em áreas localizadas no sul, que no presente estão submersas pelo oceano.

## DISCUSSÃO

### DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética dada pela heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) nas populações do complexo *Cryptanthus zonatus* foi considerada baixa a moderada quando comparada com outras espécies de bromélias, tais como *Vriesea gigantea* Gaudich. (Palma-Silva *et al.*, 2009) e *Bromelia antiacantha* Bertoloni (Zanella *et al.*, 2011), espécies que ocorrem em áreas de floresta, assim como o complexo *C. zonatus*. A diversidade genética do complexo é mais semelhante com a encontrada em bromélias que ocorrem em afloramentos rochosos, tais como *Alcantarea regina* (Vell.) Harms (Barbará *et al.*, 2008), *Pitcairnia albiflos* Herb., *Pitcairnia staminea* Lodd. (Palma-Silva *et al.*, 2011), que são naturalmente fragmentadas com baixo fluxo gênico interpopulacional. Porém, a diversidade genética do complexo *C. zonatus* é considerada maior do que a encontrada com outras espécies que ocorrem em afloramentos rochosos, tais como *Alcantarea geniculata* (Wawra) J.R. Grant (Barbará *et al.*, 2007), *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms (Barbará *et al.*, 2007) e *Alcantarea glaziouana* (Leme) J.R. Grant (Barbará *et al.*, 2008).

### ESTRUTURA GENÉTICA E IMPLICAÇÕES TAXONÔMICAS

A hipótese de que *Cryptanthus burle-marxii* e *Cryptanthus zonatus* compreendem uma única espécie foi testada utilizando o conceito de espécie apresentado por de Queiroz (2007). Dois agrupamentos genéticos (*STRUCTURE*,  $K=2$ ) foram formados. Duas populações (PED-RN e MES-RN) do agrupamento I, que é formado por três populações (PED-RN, MES-RN e MIC-PB) localizadas no norte, são identificadas como *C. zonatus* por Versieux *et al.* (2013).

Todas as populações do agrupamento II (MCU-PE, MOM-PE, EEC-PE, USJ-PE e SCO-PE) localizadas no sul, ocorrem no estado de Pernambuco, local onde há a ocorrência relatada para ambas às espécies do complexo segundo Leme & Siqueira-Filho (2006). Com base na morfologia e no ambiente indicado por Leme & Siqueira-Filho (2006) para diferenciar as duas espécies, esse agrupamento foi formado por populações que apresentam propagação vegetativa por meio de rizomas (USJ-PE, MCU-PE e MOM-PE), característica que pertence a *C. burle-marxii* e por uma população que apresenta propagação vegetativa por meio de gemas axilares (SCO-PE), característica de *C. zonatus*. Além disso, algumas

populações ocorrem em áreas de restinga (MCU-PE e MOM-PE), ambiente que é indicado como de ocorrência para *C. burle-marxii*, e uma população (SCO-PE) ocorre em Brejo de altitude, área de ocorrência de *C. zonatus*, segundo Leme & Siqueira-Filho (2006). Com base no material examinado por Leme & Siqueira-Filho (2006), duas populações analisadas poderiam ser identificadas como *Cryptanthus burle-marxii*: EEC-PE e MCU-PE. No presente estudo, houve dificuldade de definir a espécie até mesmo na população MCU-PE, pela propagação vegetativa e o ambiente em que a população ocorre, a população seria identificada como *C. burle-marxii*, porém, pelo comprimento das folhas, pétalas e sépalas seria identificada como *C. zonatus*.

Os dois agrupamentos formados indicam que não há duas entidades diferenciadas, pois eles não estão de acordo com as diferenças morfológicas utilizadas para separar as duas espécies. Dentro de um mesmo agrupamento há populações com características de *C. burle-marxii* e de *C. zonatus*, comprovando que não diferenças genéticas suficientes para a separação das duas espécies. Ao invés dos agrupamentos terem sido formados com base na morfologia, eles foram formados com base na geografia. E apesar de haver dois agrupamentos genéticos, a diferenciação entre eles é baixa. A diferenciação genética é maior dentro das populações ( $F_{ST} = 0,272$ ) do que entre os grupos ( $F_{CT} = 0,054$ ). Além disso, houve mistura entre as populações que ocorrem em áreas de restinga do agrupamento I (PED-RN, MES-RN e MIC-PB) com o agrupamento II (MCU-PE e MOM-PE), o que não justifica a existência de duas espécies também com base na geografia.

Portanto, os dados apresentados indicam que *Cryptanthus burle-marxii* e *C. zonatus* são dois nomes aplicados à mesma espécie. Dessa forma, é sugerido que *C. burle-marxii* seja sinonimizado em *C. zonatus* (que é o nome mais antigo - de acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas). Daqui para frente, quando a espécie *Cryptanthus zonatus* for referida, já incluirá as populações que anteriormente era considerada como *C. burle-marxii*.

## ESTRUTURA GENÉTICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA

As populações de *Cryptanthus zonatus* apresentaram baixos valores de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), que é provavelmente explicado pela polinização cruzada da espécie, como mostrado por Oliveira-Júnior (2015). Oliveira-Júnior (2015) em experimentos com

uma população de *C. zonatus* mostrou que a espécie é auto-incompatível e os cruzamentos são mais eficientes quando são realizados entre diferentes aglomerações de indivíduos. Os valores de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foram bem menores do que o encontrado em outras bromélias que apresentam características semelhantes a *C. zonatus*, tal como *Bromelia antiacantha* que ocorre em floresta (Zanella *et al.* 2011), apresenta propagação por rizomas (Smith & Downs 1979), é considerada parcialmente auto-incompatível e é visitada por beija-flor e abelha (Canela & Sazima 2005; Zanella *et al.* 2011); e *Vriesea gigantea*, que ocorre em floresta (Palma-Silva *et al.* 2009) e é polinizada por morcegos (Sazima *et al.* 1999; Palma-Silva *et al.* 2009).

Das oito populações de *C. zonatus* analisadas, cinco populações estão fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Das cinco que estão fora do equilíbrio, quatro sofreram gargalo genético. Os números de clones encontrados nas populações que sofreram gargalo genético foram altos em relação às outras populações. O que poderia levar a uma atenuação dos efeitos da deriva genética nessas populações que estão sofrendo gargalo genético com a reprodução assexuada (clonal), assim como é encontrado para a espécie *Tillandsia achyrostachys* por González-Astorga *et al.* (2004). Possivelmente, as populações que sofreram gargalo genético passam a produzir mais clones para tentar manter a população. Com mais indivíduos na população, a chance posterior de reprodução sexuada é maior.

## HIPÓTESES FILOGEOGRÁFICAS

As oscilações climáticas do quaternário com os períodos glaciais e interglaciais produziram grandes mudanças nas distribuições das espécies (Hewitt, 2000). O impacto dessas oscilações climáticas sobre a biodiversidade da Floresta Atlântica brasileira tem sido amplamente discutido (Cardoso *et al.*, 2015). O presente estudo contribui para o conhecimento dos padrões filogeográficos da espécie *Cryptanthus zonatus*, que é restrita a Floresta Atlântica brasileira, visando entender como as mudanças climáticas do quaternário modificaram a sua estrutura genética e distribuição geográfica.

Os resultados das análises de modelagem de nicho ecológico e de estrutura genética indicaram que a distribuição geográfica e estrutura genética de *C. zonatus* pode ter sofrido modificações no quaternário. Os modelos mostram que a distribuição potencial da espécie

era contínua no Último Máximo Glacial (UMG; Fig. 6A), enquanto que no Holoceno médio (Fig. 6B) e no presente (Fig. 6C) houve uma disjunção entre as populações do norte e sul.

A distribuição potencial da espécie no UMG era maior nas áreas localizadas mais ao sul (Fig. 6A), onde no Holoceno médio (Fig. 6B) e no presente (Fig. 6C) é coberta pelo oceano. Possivelmente a distribuição era maior devido a regressão marinha e o consequentemente aumento da disponibilidade de áreas terrestres no UMG (Leite *et al.*, 2015). Com a expansão das calotas polares nesse período, o volume de gelo acumulado reduziu o nível do mar em cerca de 120 m (Fairbanks, 1989; Rohling *et al.*, 1998; Clapperton, 1993; Hewitt, 2000).

O recuo do nível do mar pode ter disponibilizado novas áreas para a colonização de florestas e consequentemente aumentado à área de ocorrência de *Cryptanthus zonatus*, como mostrado na Figura 6A. O alargamento litorâneo com a disponibilidade de novas áreas devido à regressão marinha no litoral brasileiro foi recentemente relatado para formigas (Cardoso *et al.* 2015) e mamíferos (Leite *et al.* 2015). Leite *et al.* (2015) ainda indicaram que o recuo do nível do mar teria exposto a plataforma continental brasileira, o que teria permitido a Floresta Atlântica e espécies adaptadas a floresta (como é o caso dos mamíferos apresentados no estudo) a se expandirem também. Esta ideia é chamada de hipótese *Atlantis Forest* por Leite *et al.* (2015).

As condições climáticas dos trópicos no UMG eram mais frias e secas e, neste período grandes áreas de florestas foram substituídas por áreas de savanas e de desertos (Hewitt, 2000). Pelos resultados da modelagem de nicho ecológico para UMG não é possível indicar se houve redução da área de distribuição geográfica do complexo como seria esperado já que o complexo ocorre exclusivamente em áreas de floresta. É apenas sugerido que a distribuição potencial da espécie poderia ter sido maior nas áreas localizadas ao sul devido ao recuo do nível do mar.

No Holoceno Médio (Fig. 6B) e no presente (Fig. 6C) é observada a potencial separação da distribuição de *Cryptanthus zonatus*, provavelmente devido a uma barreira ecológica. Os dados do STRUCTURE (Fig. 4) corroboram com os dados obtidos na modelagem de nicho ecológico, onde há a potencial separação da distribuição de *C. zonatus* no Holoceno Médio até o presente formando dois grupos geneticamente estruturados, um ao

norte e outro ao sul da barreira ecológica. A formação dos dois agrupamentos é de origem recente (~6.000 anos atrás) e a diferenciação genética ainda é baixa, porém significativa e entre eles ( $F_{CT} = 0,054$ ; valor de  $P = 0.005$ ). Provavelmente as populações de *C. zonatus* eram mais contínuas e conectadas no passado (Fig. 6A), e a separação em dois grupos (Norte e Sul) ocorreu devido a um processo de vicariância ao invés de dispersão, pois os valores de diversidade genética foram praticamente iguais nas populações.

### IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO

Os resultados deste estudo mostram que *C. burle-marxii* e *C. zonatus* são dois nomes dados à mesma espécie. Como são uma única espécie, é sugerido que *C. burle-marxii* seja sinonimizado a *C. zonatus*, e que seja revisado o status de conservação da espécie. Este trabalho apresenta o primeiro registro da espécie para o estado da Paraíba (população MIC-PB), o material já tinha sido coletado e depositado no herbário desde 2004, porém estava sem identificação. E recentemente em um guia de imagens, Pontes & Forzza (2015) indicaram ela como sendo uma possível espécie nova, porém, o presente estudo mostra que é *C. zonatus*.

Este trabalho mostra que há poucas populações da espécie e algumas têm baixo tamanho populacional como é o caso da população da EEC-PE que só tem 12 indivíduos dos quais sete foram detectados como clones. O baixo número de indivíduos ameaça a persistência desta população, já que, pequenos tamanhos populacionais tendem a reduzir a variação genética, e podem levar a uma diminuição da capacidade das populações se adaptarem aos desafios ecológicos (DeSalle e Amato, 2004). A população da EEC-PE foi a que apresentou o menor número de alelos (15), riqueza alélica (1,5) e heterozigosidade esperada (0,258). Uma estratégia que poderia ser usada para a conservação desta população, de modo a evitar ainda mais o empobrecimento genético dela seria a introdução manual de pólen ou sementes de outras populações do mesmo grupo genético. Essa estratégia já foi proposta Gareca *et al.* (2013) para a conservação de uma espécie fragmentada dos Andes.

O estudo de genética de populações pode propor populações prioritárias para a conservação com base em dados de diversidade genética tal como riqueza alélica, como sugerido por Petit *et al.* (1998) e proposto por Ribeiro *et al.* (2011) para a conservação das

populações de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. Das oito populações analisadas, uma população está completamente fora de unidade de conservação (MCU-PE), e duas populações (MIC-PB e MOM-PE), estão parcialmente protegidas, pois alguns indivíduos estão dentro e outros estão fora das unidades de conservação existentes. As populações da MCU-PE e MOM-PE são de extrema importância para a conservação, pois ambas apresentaram altos valores de diversidade genética em relação às demais populações analisadas. A população da MOM-PE foi a que apresentou o maior número de alelos privados ( $PA = 6$ ), número de alelos ( $A = 45$ ), riqueza alélica ( $R = 3,20$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_E = 0,543$ ) em relação às demais populações analisadas. Em 2012, a área da população da MOM-PE sofreu queimadas e a área é frequentemente usada para corte de lenha, o que ameaça a população, já que a espécie ocorre em áreas exclusivamente sombreadas.

Ambas as populações da MOM-PE e da MCU-PE estão em áreas de restinga assim como outras populações da espécie (PED-RN, MES-RN, MIC-PB). As restingas são ambientes que sofreram intensa degradação e sofrem grande especulação imobiliária. A população MIC-PB, apesar de estar presente em uma área de Reserva Legal, grande parte da restinga no entorno, onde tem vários indivíduos da espécie já tem autorização para ser derrubada para utilização do solo para mineração. A conservação desta população é importante, pois ela representa o primeiro e único registro da espécie para o estado da Paraíba.

Para a conservação da espécie a preservação *in situ* é importante, é necessário estabelecer uma nova unidade de conservação para proteger a população da MCU-PE e ampliar a unidade de conservação que está à população da MOM-PE. Além disso, é necessário que haja fiscalização nas unidades de conservação existentes, pois a perda de alguma população poderia levar a uma grande perda na variabilidade genética, já que a diferenciação genética dentro das populações ( $F_{ST} = 0,272$ ) é considerada alta e a maioria das populações apresentaram alelos privados.

## CONCLUSÕES

O estudo apresentado mostra que *Cryptanthus burle-marxii* e *C. zonatus* são dois nomes dados à mesma espécie. Dessa forma, sugere-se que *C. burle-marxii* seja

sinonimizado em *C. zonatus* (o nome mais antigo - de acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas) e que seja reavaliado o status de conservação da espécie, já que *C. burle-marxii* e *C. zonatus*, eram indicadas como ameaçadas de extinção. Além disso, o estudo apresentou a filogeografia descritiva da espécie, indicando que a distribuição geográfica e estrutura genética do complexo *C. zonatus* pode ter sofrido modificações no quaternário. No Último Máximo Glacial a distribuição geográfica da espécie era contínua e maior em algumas áreas onde no presente é mar, o que pode possivelmente ter ocorrido devido à regressão do nível do mar neste local. A regressão marinha pode ter possibilitado a colonização dessas áreas por restinga arbórea e consequentemente aumentado a área de ocorrência de *C. zonatus*. No Holoceno médio houve a potencial separação da distribuição formando dois grupos, um ao norte e outro ao sul, possivelmente devido a uma barreira ecológica que permaneceu até o período presente, corroborando com os dados de estrutura genética. Para a conservação da espécie a preservação *in situ* é importante, é necessário estabelecer uma nova unidade de conservação e ampliar outra unidade de conservação.

### AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE). Os autores agradecem ao Projeto Universal, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (449686/2014-0) e ao Projeto Floresta Atlântica, financiado pelo CNPq, NSF (DEB-0946618), Velux Stiftung e Beneficia Foundation. Os autores também agradecem ao laboratório CEIS da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Rio Claro, pela genotipagem das amostras.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Alves M, Marcucci R. 2015.** Nomenclatural correction in *Cryptanthus* Otto & A. Dietrich. (Bromeliaceae - Bromelioideae). *Rodriguésia* **66 (2)**: 661-664.

- Aoki-Gonçalves F, Louzada RB, Souza LM, Palma-Silva C. 2014.** Microsatellite Loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) Species Adapted to Neotropical Rock Outcrops. *Applications in Plant Sciences* **2** (3): 1–4.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C. 2007.** Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to Neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata*. *Molecular Ecology* **16**: 1981–1992.
- Barbará T, Lexer C, Martinelli G, Mayo S, Fay MF, Heuertz M. 2008.** Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity* **101**: 285–296.
- 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.
- Buckley D. 2009.** Toward an organismal, integrative, and iterative phylogeography. *BioEssays* **31**:784–793.
- Caddah MK, Mayer JLS, Bittrich V, Amaral MCE. 2012.** Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. *Botanical Journal of the Linnean Society* **168**: 101–115.
- Cardoso DC, Cristiano MP, Tavares MG, Schubart CD, Heinze, J. 2015.** Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic Forest coast: remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure. *BMC Evolutionary Biology* **15** (106): 1-13.

- Canela MBF, Sazima M. 2005.** The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in southeastern Brazil: Ornithophilous versus melittophilous features. *Plant Biology* **7**: 411 – 416 .
- Cavalli-Sforza L, Edwards A. 1967.** Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **21**: 550–570.
- Clapperton CM. 1993.** Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeography, Paleoclimatology, Palaeoecology* **101**: 189-208.
- de Queiroz K. 2007.** Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* **56** (6): 879–886.
- DeSalle R, Amato G. 2004.** The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* **5**: 702-712
- Dieringer D, Schlotterer C. 2003.** Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3**: 167–169.
- Doyle JA, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- Duminil J, Di Michele M. 2009.** Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems* **143** (3): 528-542.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**: 47–50.
- Felsenstein J. 2004.** PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.6. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle.

**Ferreira DMC, Neri J, Palma-Silva C, Pinangé DS, Benko-Iseppon AM, Louzada RB.**

Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in two species of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). (Dados não publicados)

**Forzza RC, Costa A, Siqueira-Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L.**

**2016.** Bromeliaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5991>>.

**Forzza RC, Costa AF, Leme EMC, Versieux LM, Wanderley MGL, Louzada RB, Monteiro RF, Judice DM, Fernandez EP, Borges RAX, Penedo TSA, Monteiro NP, Moraes MA. 2013.** Bromeliaceae. In: Martinelli G, Moraes MA, orgs. *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 315-396.

**Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, McGuire JÁ, Moritz C. 2012.** Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* **27** (9): 480-488.

**Fundação Biodiversistas. 2005.** *Lista da flora brasileira ameaçada de extinção*. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/>

**Gareca EE, Breyne P, Vandepitte K, Cahill JRA, Fernandez M, Honnay O. 2013.** Genetic diversity of Andean *Polylepis* (Rosaceae) woodlands and inferences regarding their fragmentation history. *Botanical Journal of the Linnean Society* **172**: 544–554.

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

- González-Astorga J, Cruz-Agón A, Flores-Palacios A, Vovides AP. 2004.** Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* **94**: 545–551.
- Goudet J. 1995.** FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485–486.
- Hausdorf B, Hennig C. 2010.** Species Delimitation Using Dominant and Codominant Multilocus Markers. *Systematic Biology* **59**: 1-13.
- Hewitt G. 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005.** Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965–1978.
- Hijmans RJ, Guarino L, Bussink C, Mathur P, Cruz M, Barrentes I, Rojas E. 2012.** DIVA-GIS 7.5. A geographic information system for the analysis of species distribution data. Manual disponível em: <http://www.diva-gis.org>.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2009.** Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**:1322–1332.
- IUCN. 2002.** IUCN technical guidelines on the management of ex-situ populations for conservation. Disponível em: <http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Rep-2002-017.pdf>
- Kramer AT, Havens K. 2009.** Plant conservation genetics in a changing world. *Trends in Plant Science* **14 (11)**: 599-607.
- Ledru MP, Salatino MLF, Ceccantini G, Salatino A, Pinheiro F, Pintaud JC. 2007.** Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Diversity and Distributions* **13**: 761–771.

- Leite YLR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS, Fagundes V, Paresque R, Passamani M, Pardini R. 2015.** Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *PNAS Early Edition*: 1-6.
- Leme EMC. 1990.** A new ornamental *Cryptanthus* from Pernambuco. *Cryptanthus Society Journal* 5: 12-13.
- Leme, EMC, Siqueira-Filho, JA. 2006.** Taxonomia das bromélias dos fragmentos de mata atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: Siqueira-Filho JA, Leme EMC, eds. *Fragmentos de mata atlântica do Nordeste – biodiversidade, conservação e suas bromélias*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, 190-381.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM, Freitas LB. 2005.** Phylogeographic Inferences Concerning Evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) Based on ITS (nrDNA) Variation. *Annals of Botany* **95**: 799–806.
- Miao YC, Su JR, Zhang ZJ, Lang XD, Liu W, Li SF. 2015.** Microsatellite markers indicate genetic differences between cultivated and natural populations of endangered *Taxus yunnanensis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 450–461.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. 2008.** Instrução Normativa nº 6, 23 de setembro de 2008. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom\\_boletins/\\_arquivos/83\\_19092008034949.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf)
- Oliveira-Júnior JBO. 2015.** Fenologia da floração e ecologia reprodutiva da Bromeliaceae ameaçada *Cryptanthus burle-marxii* Leme e simpatria com *Cryptanthus alagoanus* Leme & J.A. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C. 2008.** Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Resources* **8**: 980-982.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2007.** A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes* **7**: 654-657.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi, GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2009.** Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* **103**: 503–512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C. 2011.** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* **20**: 3185–3201.
- Pante E, Puillandre N, Viricel A, Arnaud-Haond S, Aurelle D, Castelin M, Chenuil A, Destombe C, Forcioli D, Valero M, Viard F, Samadi S. 2015.** Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology* **24**: 525–544.
- Petit RJ, Mousadik AE, Pons O. 1998.** Identifying Populations for Conservation on the basis of Genetic Markers. *Conservation Biology* **12 (4)**: 844-855.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S. 2011.** Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography* **38 (10)**: 1923-1935.

**Pinheiro F, Cozzolino S, Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM. 2013.**

Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*: 1-16.

**Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999.** Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**: 502–503.

**Pontes RAS, Forzza RC. 2015.** *Bromeliaceae do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.*

*Bromelias da Paraíba.* Disponível em:  
[http://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/532\\_brasil-bromelias\\_da\\_paraiba\\_a1.pdf](http://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/532_brasil-bromelias_da_paraiba_a1.pdf)

**Ramírez-Morillo IM. 1996.** Systematics, Phylogeny, and Chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). Tese de doutorado, University of Missouri-St. Louis.

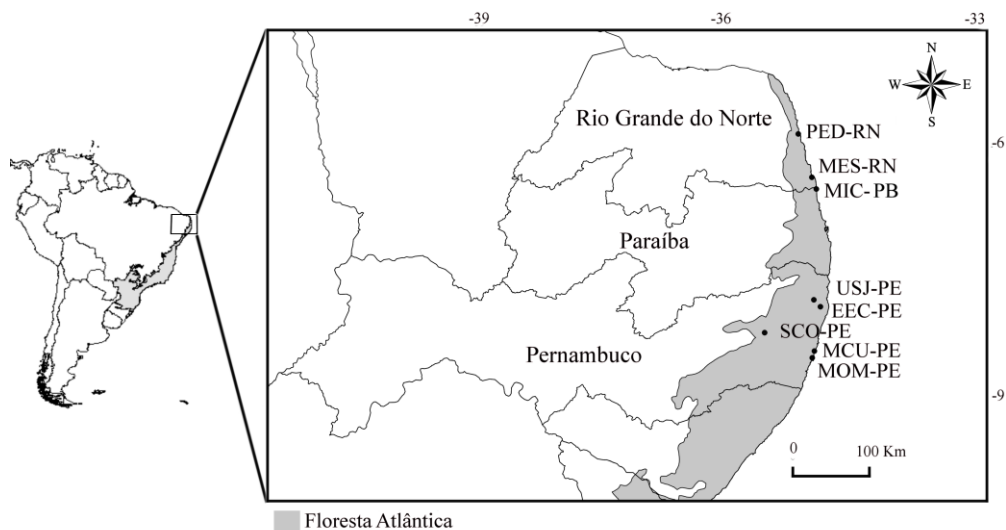
**Raymond M, Rousset F. 1995.** GENEPOP (version-1.2)— population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248–249.

**Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB. 2011.** Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* **106**: 46–57

**Rogstad SH. 1992.** Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon* **41**: 701–708.

**Sazima M, Buzato S, Sazima I. 1999.** Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. *Annals of Botany* **83**: 705–712.

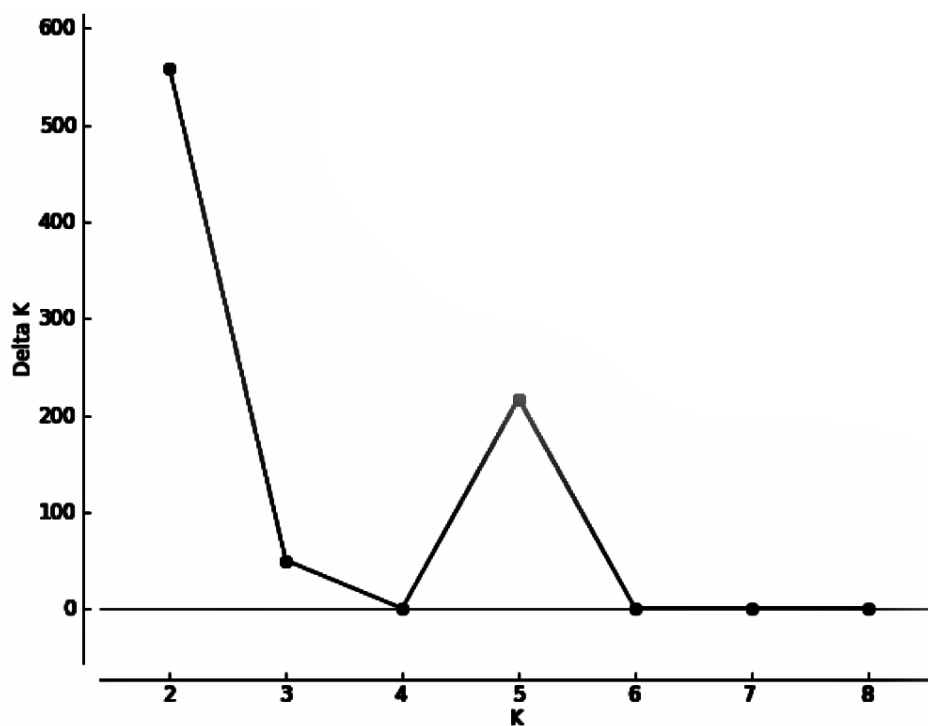
- Shao YZ, Xiang QP.** 2015. Species delimitation and phylogeography of the *Abies chensiensis* complex inferred from morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 175–188.
- Smith LB, Downs RJ.** 1979. *Bromelioideae (Bromeliaceae)*. Flora Neotropica. Monograph 14, vol. 3. USA: Hafner Press.
- Valière N.** 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* **2**: 377–379.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P.** 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**: 535–538.
- Versieux LM, Magalhães R, Calvente A.** 2013. Extension of the *Cryptanthus* range in Northeastern Brazil with new findings in the phenotypic variation including changes in the trichome's distribution, thus enhancing the understanding of the *Cryptanthus zonatus* complex (Bromeliaceae). *Phytotaxa* **109 (1)**: 54–60.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G.** 2005. *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. 2nd ed. London, New York, Singapore: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F.** 2011. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **98 (9)**: 1511–1519.
- Zhang D-X, Hewitt GM.** 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* **12**: 563–584.



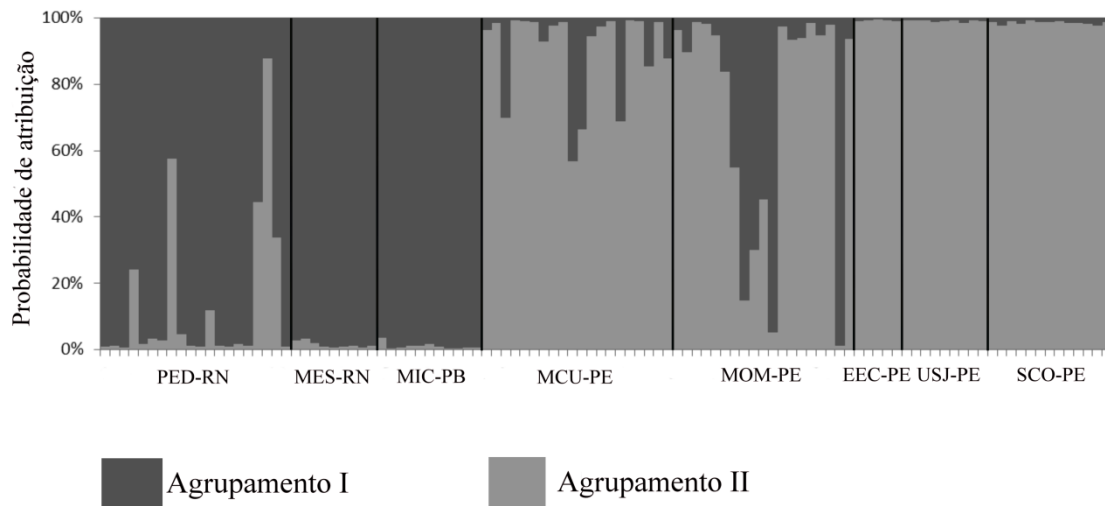
**Figura 1** – Distribuição geográfica das populações amostradas do complexo *Cryptanthus zonatus* na Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil. A área demarcada em cinza representa os limites históricos da Floresta Atlântica. Para as abreviaturas das populações ver a Tabela 1.



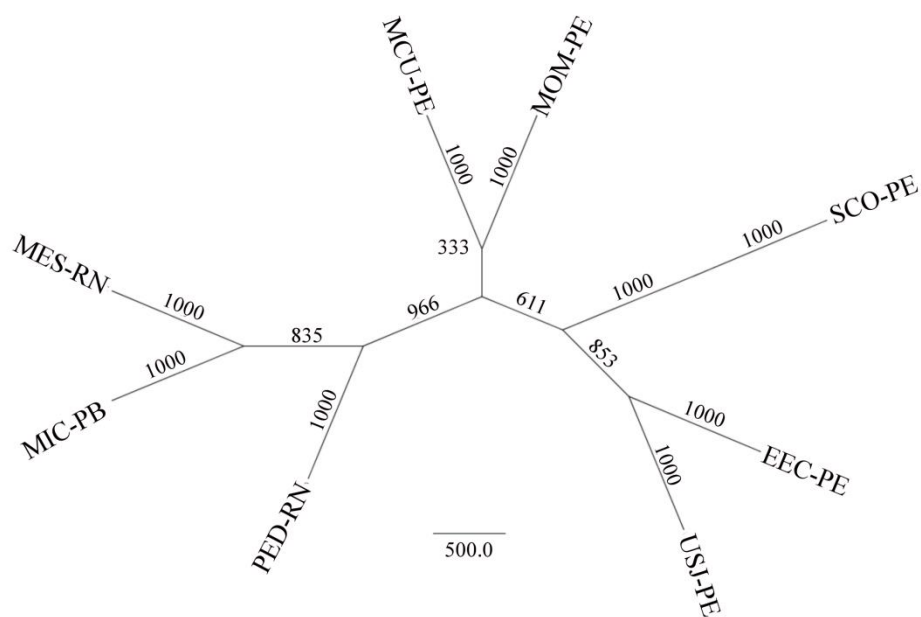
**Figura 2** – Oito populações amostradas do complexo *Cryptanthus zonatus*. A-B. Parque Estadual das Dunas de Natal. C-E. RPPN Mata Estrela. F. Mineradora Cristal. G. Usina São José. H. Estação Ecológica de Caetés. I. RPPN Serra do Contente. J-L. Mata do Cupe. M-O. RPPN Nossa Senhora do Outeiro de Maracaípe.



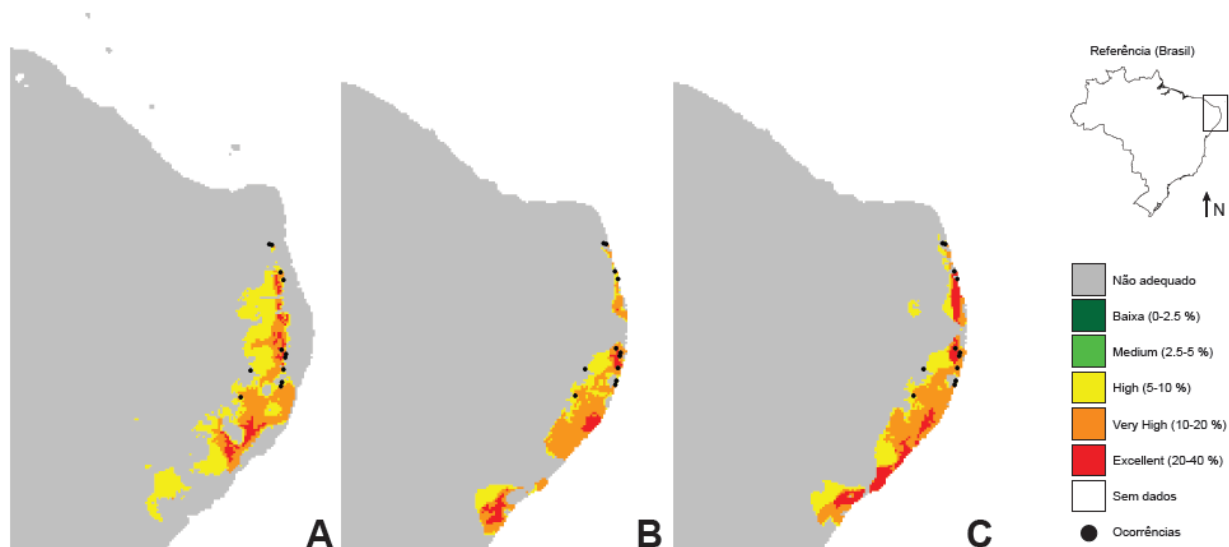
**Figura 3** – Magnitude do Delta  $K$  da análise da estrutura genética em função do  $K$  calculado com base no método Delta  $K$  proposto por Evanno et al. (2005), para os dados de microssatélites das populações do complexo *Cryptanthus zonatus*. O valor modal dessas distribuições indica o  $K$  verdadeiro, o melhor  $K$  é o  $K=2$  (dois agrupamentos genéticos).



**Figura 4** – Proporção de mistura (Q) para cada indivíduo do complexo *Cryptanthus zonatus* para o número de agrupamentos mais provável  $K=2$  (dois agrupamentos genéticos). Os dois agrupamentos genéticos identificados pelo STRUCTURE são indicados em cores diferentes e as populações estão separadas por barras verticais. Para as abreviaturas das populações ver a Tabela 1.



**Figura 5-** Árvore neighbor-joining não enraizada das populações do complexo *Cryptanthus zonatus* com base em Cavalli-Sforza & Edward's (1967), incluindo os valores de bootstrap. A escala para a distância genética é fornecida na parte inferior do gráfico. Para as abreviaturas das populações ver a Tabela 1.



**Figura 6-** Modelagem de nicho ecológico utilizando o algoritmo Bioclim, com as distribuições potenciais e probabilidade de ocorrência do complexo *Cryptanthus zonatus* no último máximo glacial (UMG: ~22.000 anos atrás) (A), no Holoceno médio (HM: ~6.000 anos atrás) (B) e no presente (C).

**Tabela 1-** Abreviações, estados, municípios, localidades, coordenadas geográficas e espécimes testemunhos das populações amostradas do complexo *Cryptanthus zonatus*.

| Abreviação da população | Estado | Município    | Localidade                                 | Coordenadas            | Voucher |
|-------------------------|--------|--------------|--------------------------------------------|------------------------|---------|
| PED-RN                  | RN     | Natal        | Parque Estadual das Dunas de Natal         | 05°51'39"S, 35°11'05"W | DC 757  |
| MES-RN                  | RN     | Baía Formosa | RPPN Mata Estrela                          | 06°22'40"S, 35°01'22"W | DC 763  |
| MIC-PB                  | PB     | Mataraca     | Mineradora Cristal                         | 06°31'04"S, 34°58'04"W | DC 779  |
| EEC-PE                  | PE     | Paulista     | Estação Ecológica de Caetés                | 07°55'15"S, 34°55'15"W | --      |
| MCU-PE                  | PE     | Ipojuca      | Mata do Cupe                               | 08°26'58"S, 34°59'33"W | DC 764  |
| MOM-PE                  | PE     | Ipojuca      | RPPN Nossa Senhora do Outeiro de Maracaípe | 08°31'48"S, 35°01'05"W | DC 765  |
| USJ-PE                  | PE     | Igarassu     | Usina São José                             | 07°50'18"S, 34°59'57"W | --      |
| SCO-PE                  | PE     | Gravatá      | RPPN Serra do Contente                     | 08°13'48"S, 35°35'10"W | DC 765  |

Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB), Pernambuco (PE).

**Tabela 2-** Caracteres indicados por Leme & Siqueira-Filho (2006), que diferencia *Cryptanthus burle-marxii* de *Cryptanthus zonatus*.

| Espécies                        | Propagação vegetativa | Compr. das folhas (cm) | Compr. das pétalas (mm) | Compr. das sépalas (mm) | Ambiente                                   |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Cryptanthus burle-marxii</i> | rizoma                | 8-20                   | 35-40                   | 13                      | Floresta costeira                          |
| <i>Cryptanthus zonatus</i>      | gema axilar           | 20-40                  | 39-45                   | 15-19                   | Floresta interiorana/<br>Brejo de altitude |

**Tabela 3-** Características morfológicas de seis populações do complexo *Cryptanthus zonatus*. Para as abreviações das populações ver Tabela 1.

| Populações | Propagação vegetativa | Compr. das folhas (cm) | Compr. das pétalas (mm) | Compr. das sépalas (mm) | Ambiente          |
|------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| PED-RN*    | --                    | 17,5-24                | --                      | --                      | Floresta costeira |
| MES-RN     | rizoma                | 16,5-27,7              | 45                      | 19                      | Floresta costeira |
| MIC-PB*    | rizoma                | 15-20                  | --                      | --                      | Floresta costeira |
| SCO-PE     | gema axilar           | 15,8-23,6              | 40-45                   | 15-18                   | Brejo de altitude |
| MCU-PE     | rizoma                | 18,9-31,3              | 42                      | 17                      | Floresta costeira |
| MOM-PE     | rizoma                | 18,2-27,1              | 46                      | 14,5-18                 | Floresta costeira |

\*Material estéril ou apenas com frutos.

**Tabela 4** – Caracterização das populações do complexo *Cryptanthus zonatus* com dez microssatélites nucleares, incluindo o tamanho da amostra (N), número de clones (N clones), número de alelos (A), número de alelos privados (PA), riqueza alélica (AR), variância do tamanho do alelo (Var), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e valor do P da análise de gargalo genético (Bo). Para as abreviações das populações ver Tabela 1.

| Populações  | N   | N Clones | A      | PA    | AR    | Var    | $H_O$ | $H_E$ | $F_{IS}$ | Bo      |
|-------------|-----|----------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|----------|---------|
| PED-RN      | 20  | 0        | 36     | 3     | 2,630 | 8,980  | 0,440 | 0,438 | -0,006   | 0,652   |
| MES-RN      | 9   | 11       | 30     | 1     | 2,740 | 10,161 | 0,480 | 0,527 | 0,097*   | 0,004** |
| MIC-PB      | 11  | 10       | 24     | 1     | 2,200 | 11,599 | 0,400 | 0,453 | 0,125*   | 0,002** |
| MCU-PE      | 20  | 0        | 31     | 1     | 2,540 | 4,440  | 0,407 | 0,459 | 0,117    | 0,125   |
| MOM-PE      | 19  | 0        | 45     | 6     | 3,200 | 10,276 | 0,448 | 0,543 | 0,179*   | 0,754   |
| EEC-PE      | 5   | 7        | 15     | 0     | 1,500 | 1,765  | 0,433 | 0,258 | -0,857   | 0,031   |
| USJ-PE      | 9   | 11       | 22     | 2     | 2,080 | 10,400 | 0,823 | 0,503 | -0,709*  | 0,001** |
| SCO-PE      | 13  | 2        | 28     | 3     | 2,470 | 31,391 | 0,458 | 0,509 | 0,103*   | 0,003** |
| Total/média | 106 | 41       | 28.875 | 2.125 | 2,420 | 11,127 | 0,486 | 0,461 | -0,119   | 0,197   |

\*Desvio do equilíbrio de Hardy–Weinberg ( $P < 0.05$ ).

\*\*Populações onde os gargalos genéticos foram detectados ( $P < 0.005$ ).

**Tabela 5** – Caracterização de dez marcadores microssatélites nucleares nas populações do complexo *Cryptanthus zonatus*, incluindo a fonte do marcador, intervalo do tamanho molecular em pares de base (bp), número de alelos ( $A$ ), riqueza alélica ( $AR$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), coeficiente total de endogamia ( $F_{IT}$ ) e índice de fixação ( $F_{ST}$ ). Para as abreviações dos locos ver os materiais e métodos.

| Loco  | Tamanho (pb) | $A$ | $AR$  | $H_O$ | $H_E$ | $F_{IS}$ | $F_{IT}$ | $F_{ST}$ |
|-------|--------------|-----|-------|-------|-------|----------|----------|----------|
| Ac01  | 281-295      | 6   | 2,965 | 0,602 | 0,461 | -0,270*  | -0,082   | 0,215    |
| Op17  | 167-181      | 5   | 3,138 | 0,471 | 0,450 | -0,027   | 0,291    | 0,352    |
| Op25  | 165-179      | 5   | 3,202 | 0,465 | 0,446 | -0,024   | 0,303    | 0,359    |
| Op30  | 132-154      | 9   | 4,679 | 0,683 | 0,609 | -0,169*  | 0,190    | 0,321    |
| Op52  | 245-273      | 6   | 2,072 | 0,251 | 0,274 | 0,098*   | 0,538    | 0,536    |
| Op69  | 114-136      | 11  | 5,764 | 0,612 | 0,599 | -0,009*  | 0,290    | 0,333    |
| Op77A | 157-161      | 3   | 1,698 | 0,215 | 0,153 | -0,275   | -0,033   | 0,299    |
| Op78  | 221-233      | 6   | 4,457 | 0,580 | 0,568 | -0,063   | 0,250    | 0,299    |
| PaC05 | 165-207      | 17  | 6,440 | 0,578 | 0,699 | 0,095*   | 0,348    | 0,250    |
| VgA04 | 175-179      | 3   | 2,153 | 0,406 | 0,354 | -0,131   | 0,024    | 0,186    |

\*Desvio do equilíbrio de Hardy–Weinberg ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 6** – Análise de variância molecular ( $_{AMOVA}$ ) para microssatélites nucleares.

| Fonte de variação                  | Soma dos quadrados | Componentes de variação | Porcentagem de variação | Estatísticas F   | Valor de P |
|------------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|------------|
| Entre grupos                       | 40,204             | 0,178                   | 5,454                   | $F_{CT} = 0,054$ | 0.005      |
| Entre populações dentro dos grupos | 111,207            | 0,711                   | 21,788                  | $F_{SC} = 0,230$ | 0          |
| Dentro das populações              | 447,588            | 2,377                   | 72,757                  | $F_{ST} = 0,272$ | 0          |

**Tabela 7** – Tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) e número efetivo de migrantes ( $N_em$ ) entre os pares de populações, para as populações do complexo *Cryptanthus zonatus*, estimados seguindo Beerli & Felsenstein (1999) com o programa MIGRATE 2.0.6. Para as abreviações das populações ver Tabela 1.

| Populações        | $N_{e1}$ | $N_{e2}$ | $N_{em1} - N_{em2}$ | $N_{em2} - N_{em1}$ |
|-------------------|----------|----------|---------------------|---------------------|
| PED-RN1 / MES-RN2 | 289,350  | 377,450  | 0,636               | 1,033               |
| PED-RN1 / MIC-PB2 | 504,875  | 115,150  | 0,321               | 0,240               |
| PED-RN1 / MOM-PE2 | 374,675  | 119,825  | 0,251               | 0,136               |
| MES-RN1 / MIC-PB2 | 417,300  | 111,225  | 0,656               | 0,172               |
| MIC-PB1 /MCU-PE2  | 157,575  | 463,975  | 0,095               | 0,379               |
| MIC-PB / MOM-PE2  | 130,225  | 147,475  | 0,115               | 0,270               |
| MCU-PE / MOM-PE2  | 288,025  | 1068,400 | 0,243               | 0,320               |
| MCU-PE1 / USJ-PE2 | 334,475  | 262,425  | 0,054               | 0,284               |
| MCU-PE1/ EEC-PE2  | 622,250  | 88,425   | 0,232               | 0,322               |
| USJ-PE1 / EEC-PE2 | 133,450  | 73,500   | 0,031               | 0,535               |
| USJ-PE1 / SCO-PE2 | 321,650  | 221,700  | 0,207               | 0,149               |
| EEC-PE1 / SCO-PE2 | 293,700  | 343,850  | 0,288               | 0,007               |

## CONCLUSÕES

- *Cryptanthus burle-marxii* e *Cryptanthus zonatus* são dois nomes aplicados à mesma espécie.
- A distribuição geográfica e estrutura genética do complexo *C. zonatus* pode ter sofrido modificações no quaternário. No Último Máximo Glacial a distribuição potencial da espécie era contínua e maior nas áreas ao sul, onde atualmente é mar, possivelmente devido à regressão do nível do mar. No Holoceno médio houve a potencial separação da distribuição da espécie, provavelmente devido a uma barreira ecológica que permaneceu até o período presente, formando dois grupos geneticamente estruturados, um ao norte e outro ao sul.
- Este trabalho apresenta o primeiro registro da espécie para o estado da Paraíba.
- Para a conservação da espécie a preservação *in situ* é importante. Além da necessidade de fiscalização das unidades de conservação existentes, é necessário estabelecer uma nova unidade de conservação para proteger a população da Mata do Cupe (PE) e ampliar a unidade de conservação onde está a população da RPPN Mata do Outeiro de Maracápe (PE).

## ANEXOS

**Normas para publicação no periódico Brazilian Journal of Botany (disponível em <http://www.scielo.br/revistas/rbb/iinstruc.htm#03>):**

### **Instructions to the Authors**

The Brazilian Journal of Botany (BrazJBot) is a periodical published by the Sociedade Botânica de São Paulo (SBSP) reporting the results of original botanical research as complete articles or scientific notes in English. Either British English or American English spelling and terminology may be used, but must be consistent throughout the text.

Manuscripts should be double-spaced throughout, with consecutive page numbering. Use Word for Windows 2000 (or later versions), font Times New Roman, size 12. Place only one space between words and do not hyphenate them at the end of a line. Do not use tabulation (Tab key) except at the beginning of each paragraph. Do not use bold or underline (except in subtitles). Restrict italics to scientific names, descriptions or diagnosis of new taxa, the names and numbers of collectors, and for genetic or statistical symbols.

#### **Manuscript format**

**First page** - Title: concise and informative (in bold); authors' full names (**in capital letters**); affiliation, complete address, corresponding author and respective e-mail, all as footnotes; running title.

**Second page** - **ABSTRACT** (include title), Key words (up to 5, in alphabetical order without repeating any title words).

**Text** - Start a new page each according to the following sequence of items: **INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, and REFERENCES**. Acknowledgements should be placed before the references.

First-level headings - capitalize the first letter, bold, not centered.

Second-level headings- italic, bold, same font as the first-level heading, followed by the text on the same line but separated by dash (-).

Do not use third-level headings.

Cite each figure and table in the text in numerical order.

Present references according to the following examples: Smith (1960) or (Smith 1960); Smith (1960, 1973); Smith (1960a, b); Smith & Gomez (1979) or (Smith & Gomez 1979); Smith et al. (1990) or (Smith et al. 1990); (Smith 1989, Liu & Barros 1993, Araujo et al. 1996, Sanches 1997).

**Normas para publicação no periódico Botanical Journal of the Linnean Society (disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1095-8339/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1095-8339/homepage/ForAuthors.html)):**

**Instructions for Authors**

The Linnean Society publishes four periodicals: the *Biological*, *Botanical* and *Zoological Journals*, and *The Linnean*, the Society's newsletter and proceedings.

The *Botanical Journal of the Linnean Society* publishes original papers on systematic and evolutionary botany and comparative studies of both living and fossil plants. Review papers are also welcomed which integrate fields such as cytology, morphogenesis, palynology and phytochemistry into a taxonomic framework. The journal will only publish new taxa in exceptional circumstances as part of larger monographic or phylogenetic revisions.

Submissions to the *Botanical Journal* are made on-line using ScholarOne Manuscripts. To submit to the Journal go to <http://mc.manuscriptcentral.com/botjls>. If this is the first time you have used the system you will be asked to register by clicking on 'create an account'. Full instructions on making your submission are provided. You should receive an acknowledgement within a few minutes. Thereafter, the system will keep you informed of the process of your submission through refereeing, any revisions that are required, and a final decision.

Manuscripts submitted by other methods will not be considered.

**Conflict of Interest**

The *Botanical Journal of the Linnean Society* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in a cover letter to the Editor, in the manuscript (under the Acknowledgement section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships. Corresponding authors will be asked to confirm whether or not a conflict of interest exists as part of the submission process.

**Ethical Guidelines**

The Journal expects authors to abide by the guidelines of those statutory bodies, or, discipline that are specific to the country of origin, or, execution of the research.

**Copyright**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to log into Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

**For authors signing the copyright transfer agreement**