



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

JÉSSICA FIGUERÊDO CAMPOS DE JESUS

**GENÉTICA POPULACIONAL DO COMPLEXO *Hohenbergia ridleyi* (BAKER)
MEZ NO NORDESTE BRASILEIRO**

Recife

2018

JÉSSICA FIGUERÊDO CAMPOS DE JESUS

**GENÉTICA POPULACIONAL DO COMPLEXO *Hohenbergia ridleyi* (BAKER) MEZ
NO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Benko- Iseppon.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo César Gonçalves de Oliveira.

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Jesus, Jéssica Figuerêdo Campos de
Genética populacional do complexo *Hohenbergia ridleyi*
(Baker) MEZ no nordeste brasileiro / Jéssica Figuerêdo Campos
de Jesus - 2018.

90 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko- Iseppon
Coorientador: Rodrigo César Gonçalves de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Floresta Atlântica 2. Bromélias 3. Diversidade genética
I. Benko- Iseppon, Ana Maria (orient.) II. Oliveira, Rodrigo César
Gonçalves de (coorient.) III. Título

576.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-306

JÉSSICA FIGUERÊDO CAMPOS DE JESUS

**GENÉTICA POPULACIONAL DO COMPLEXO *Hohenbergia ridlei* (BAKER) MEZ
NO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 24 / 07 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Valesca Pandolfi
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr. Diego Sotero de Barros Pinangé
Universidade Federal do Amazonas

Ao meu esposo Diego e a minha filha Laura, por todos os momentos que passamos para a concretização desse sonho,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre ter me dado força e discernimento para lutar e conquistar meus objetivos.

Agradeço a Prof^a Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon pela oportunidade, paciência e compreensão, minha eterna gratidão e admiração.

Agradeço ao meu coorientador Prof^o Dr Rodrigo César, por todos os ensinamentos, apoio e momentos compartilhados. Você foi essencial para a conclusão desse trabalho.

Agradeço ao apoio da minha família, meus pais (Hélia e José Wilson) por sempre me incentivar a lutar e evoluir no meu conhecimento. Em especial à minha mãe, por toda ajuda e apoio com minha filha. A minha avó Cacilda, meus irmãos (Leonardo e Murilo), minha cunhada Fabiane, meus tios e primos por acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso. Sem vocês eu não seria capaz de chegar até aqui.

Agradeço imensamente ao meu esposo Diego que sempre esteve ao meu lado, me dando força e me ajudando durante todo o meu percurso. A minha filha Laura por ser a fonte da minha energia, onde eu sempre encontrei forças para seguir adiante. Obrigada por todo amor e compreensão da necessidade da minha ausência em determinados momentos. Amo vocês.

Aos meus sogros, Janete e Gilson, por toda ajuda, incentivo e apoio dado. Serei eternamente grata pelo que fazem por mim.

Aos amigos que fiz por onde passei e irei levar para a vida. Amigos de Ilhéus, Vitória da Conquista e Recife. Obrigada por toda força e momentos proporcionados!

Aos membros do LGBV, por toda ajuda, colaboração no desenvolvimento da minha pesquisa e descontrações nos momentos de estresse. Em especial a Alexandre, Higor, Jéssica, Laura, Rodrigo, Ricardo e Will pela ajuda na reta final do trabalho.

A todos que de forma direta ou indireta me auxiliaram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

Avaliar a diversidade e estrutura genética de populações espacialmente isoladas possibilita ampliar o entendimento acerca dos padrões de distribuição das espécies bem como auxiliar em ações de manejo para conservação dos ambientes naturais. A família Bromeliaceae é evolutivamente reconhecida pela grande diversidade morfológica e radiação adaptativa, com diversificação na Floresta Atlântica do leste brasileiro. Nessa região *Hohenbergia ridleyi* (Baker) apresenta distribuição longitudinal, sendo tratada no presente trabalho como um complexo específico, incluindo *H. ramageana* e *H. isepponae*, as quais são simpátricas em sua região tipo no estado de Pernambuco, ocorrendo tanto em Floresta Atlântica costeira como em brejos de altitude, como também as espécies *H. edmundoi* e *H. salzmanii* que são comumente confundidas como pertencentes ao grupo. Esse trabalho teve como objetivos: (i) realizar a caracterização da diversidade genética de espécies de *Hohenbergia* que pertencem ao complexo *ridleyi*, (ii) identificar os possíveis efeitos dos principais eventos evolutivos que moldaram os membros do complexo, através do acesso à estrutura genética, (iii) testar a coesão de espécies dentro do complexo *ridleyi* através da análise das diferenças genéticas entre os espécimes identificados como *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* e *H. salzmanii*, tendo como hipótese que os espécimes compreendem uma única espécie. Para tal, foram aplicados dez marcadores microssatélites, sendo sete nucleares (Ac11, Ac25, Ac40, Ac50, Acom12.12, Acom64.22 e Acom71.3) e três cloroplastidiais (N10, N15, N16), em um total de 181 indivíduos pertencentes a 16 populações do complexo. As populações apresentaram baixa diversidade genética, os valores de heterozigosidade observada foram menores que os da heterozigosidade esperada. Foram obtidos 45 haplótipos com mais da metade sendo considerados privados, distribuídos em 12 das 16 populações. Os valores do teste de AMOVA indicam uma maior diferenciação genética dentro das populações (84.82%), revelando que as populações são mais similares entre si (3,29%), informação confirmada pelo baixo valor obtido do F_{st} (0.1518). Os resultados obtidos sugerem um fluxo gênico efetivo devido à polinização entre as populações do complexo, as quais apresentam uma estruturação genética distribuída em quatro clusters ($K=4$), com agrupamento por tipo da floresta. Essa é a primeira evidência de alta mistura em *Hohenbergia*, o que justifica a dificuldade em

delimitar espécies dentro do grupo. Neste caso, as espécies *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* e *H. salzmanii* correspondem a uma única entidade biológica, com grandes diferenças morfológicas. Portanto, tratamentos taxonômicos morfológicos devem ser suportados, com a definição de novos nomes, para evitar a extinção formal devido à sinonimização de diferentes morfotipos. Assim, cada morfotipo pode ser considerado para conservação.

Palavras-chave: SSR. Floresta Atlântica. Bromélias. Diversidade genética.

ABSTRACT

Assessing the diversity and genetic structure of spatially isolated populations turns it possible to broaden the understanding of patterns of distribution of species as well as assisting in conservation management actions of natural environments. The Bromeliaceae family is evolutionarily recognized by its large morphologic diversity and adaptive radiation, with diversification in West Atlantic Forest. In this region *Hohenbergia ridleyi* (Baker) presents longitudinal distribution and in the present work, it is treated as a specific complex, including *H. ramageana* and *H. isepponae*, which are sympatric in their type region in the state of Pernambuco, occurring both in coastal Atlantic Forest as in “Brejos de Altitude”, as well as the species *H. edmundoi* and *H. salzmanii* that are commonly confused as belonging to the group. This work had as objective: (i) characterize the genetic diversity of *Hohenbergia* species that belongs to the *ridleyi* complex, (ii) identify possible effects from major evolutionary events that shaped members of this complex by accessing the genetic structure, (iii) test the species cohesion within the *ridleyi* complex by analyzing the genetic differences between the specimens identified as *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* and *H. salzmanii*, addressing the hypothesis that each of them comprises a single species entity. For this, ten microsatellite markers were applied in 16 populations of the complex, being seven nuclear (Ac11, Ac25, Ac40, Ac50, Acom12.12, Acom64.22 e Acom71.3) and three chloroplastids (N10, N15, N16). The populations showed high observed heterozygosity values and half of the populations presented higher levels of observed heterozygosity than expected. The AMOVA test values indicate a greater genetic differentiation within the populations (84.82%), revealing that the populations are more similar to each other (3,29%), information confirmed by the low value obtained from F_{st} (0.1518). The results obtained suggest an effective gene flow due to pollination among the complex populations, which present a genetic structuring distributed in four clusters ($K = 4$), with grouping by forest type. That is the first evidence of high mix in *Hohenbergia*, which justifies a difficult in delimiting the species within the group. In this case, the species *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* and *H. salzmanii* correspond to a single biological entity, with great morphological differences. Therefore, morphological taxonomic treatments must be supported, with the definition

of new names, to avoid formal extinction due to the synonymizing of different morphotypes. Thus, each morphotype can be considered for conservation.

Keywords: SSR. Atlantic Forest. Bromeliads. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

- Figura 1- Distribuição filogenética das subfamílias de Bromeliaceae de acordo com classificação realizada por Givnish et al. (2007) 17
- Figura 2- Registros fotográficos do complexo ridleyi. Fotos: Rodrigo Oliveira.....27
- Figura 3- Ilustrações dos ramos das inflorescências das espécies representantes do complexo ridleyi, sendo A- *H. ridleyi* (Baker) Mez, B- *H. ramageana* Mez e C- *H. isepponae* R. Oliveira & Wand. Adaptado de Gonçalves-Oliveira & Wanderley (2017).
28
- Figura 4- Ilustração esquemática dos brejos de altitude no Nordeste brasileiro. Adaptado de Mayo & Fevereiro (1982) e Tabarelli & Santos (2004). 31

Artigo

- Figure 1- Geographic distribution of sampled populations of ridleyi complex in northeastern Brazil (see Table 1 for abbreviations). 49
- Figure 2- A- Occurrence of more frequent haplotypes in each population of ridleyi complex. * and black color for each mutated haplotype. B- Median-joining network of cpSSRs haplotypes. The circles indicate the haplotypes and the size of each circle is proportional to the observed frequency of each type. The little red circles specified with mu1 and mu2 correspond to the occurrence of mutations. 53
- Figure 3- Magnitude of ΔK from structure analysis by Evanno et al. (2005), for ridleyi complex microsatellite data. 56
- Figure 4- Bar plot of four clusters ($K = 4$) according to a STRUCTURE analysis based on seven nuSSR markers. The populations of ridleyi complex are delimited from each other by vertical black lines. See Table 1 for abbreviations. 56
- Figure 5- Relationship between genetic divergence (based on F_{st}) and geographical distances in kilometers among populations of the ridleyi complex. A- Analysis realized with nuSSR data; B- Analysis realized with cpSSR data. For both analyzes $p < 0,001$.
..... 58

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1- Comparação entre os marcadores detectáveis por PCR mais comumente utilizados. Adaptado de Mueller & Wolfenbarger (1999), Semagn; Bjørnstad; Ndjioudjop (2006) e Singh et al. (2010).	35
--	----

Artigo

Table 1- Collections of populations of the ridleyi complex in Brazilian Northeast. All populations were collected in the field in northeastern Brazilian region.	48
Table 2- Genetic diversity parameters using seven loci of nuSSR and three loci of cpSSR per populations of ridleyi complex.	52
Table 3- Analysis of molecular variance (AMOVA) for seven nuclear and three chloroplast SSR markers in populations of ridleyi complex.....	54
Table 4- Fst values comparing location regions of the ridleyi complex.	55
Table 5- Proportion of membership of each population of ridleyi complex in each of the 4 clusters. The higher proportions are highlighted in bold.	57
Table 6- Fst values of four clusters formed by analysis in STRUCTURE software based on nuSSRs applied on populations of ridleyi complex.	57
Table S1.1- Nuclear and chloroplast SSR markers transferred from related species to selected individuals of the ridleyi complex.	62
Table S2.2- Number of alleles per population obtained for the polymorphic loci of <i>Aechmea caudata</i> , <i>Ananas comosus</i> and <i>Dyckia marnier-lapostollei</i> in the populations of the ridleyi complex.	63
Table S3.3- Characterization of seven nuSSRs in populations of ridleyi complex.	64
Table S4.4- Haplotypes obtained for three cpSSR loci (N10, N15 and N16) for the populations of the ridleyi complex.	65
Table S5.5- List of private haplotypes and frequencies by population of the ridleyi complex.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Length Polymorphism</i> – Polimorfismos de tamanho amplificado
AMOVA	<i>Molecular Variance Analysis</i> – Análise molecular de variância
cpSSR	<i>Chloroplast Simple Sequence Repeat</i> – Sequências simples repetidas cloroplastidiais
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i> - Brometo de cetil-trimetilamônio
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> – Ácido desoxirribonucléico
F_{st}	<i>Interpopulational differentiation index</i> – Índice de diferenciação interpopulacional
H_e	<i>Expected Heterozygosity</i> – Heterozigosidade esperada
H_o	<i>Observed Heterozygosity</i> – Heterozigosidade observada
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i> – Sequências internas simples repetidas
mtSSR	<i>Mitochondrial Simple Sequence Repeat</i> – Sequências simples repetidas mitocondriais
nuSSR	<i>Nuclear Simple Sequence Repeat</i> – Sequências simples repetidas nucleares
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> – Amplificação randômica de DNA polimórfico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de um único nucleotídeo
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i> – Sequências simples repetidas
STR	<i>Short Tandem Repeat</i> - Repetições curtas em tandem
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> – Número variável de repetições em tandem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
3	RESULTADOS	42
3.1	ARTIGO- POPULATION GENETICS ANALYSIS REVEALS ENVIRONMENTAL INFLUENCE ON DIVERSITY PATTERNS OF A SPECIFIC BROMELIAD COMPLEX.....	42
4	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A estrutura genética das populações é moldada por diversos fatores evolutivos, como deriva genética, seleção natural e fluxo gênico, os quais estão diretamente relacionados à história de vida da espécie, bem como sua variabilidade genética e estabilidade (HEUERTZ et al., 2003; LEMES et al., 2007). A família Bromeliaceae destaca-se por apresentar rápida evolução e radiação adaptativa, assim como uma extensa diversificação morfológica, principalmente na subfamília Bromelioideae, sendo considerado um bom modelo para estudos evolutivos (GIVNISH et al., 2011). Apesar de inúmeros estudos avaliarem a estrutura genética populacional das bromélias, pouco se sabe sobre as espécies do gênero *Hohenbergia*, o qual figura entre os gêneros da família com maior número de incertezas taxonômicas (BARACHO, 2005; SIQUEIRA-FILHO; LEME, 2006). Avaliar a estrutura genética de populações espacialmente isoladas nos permite entender melhor o padrão de distribuição das espécies e os processos microevolutivos que moldam essas populações, auxiliando em ações de manejo e conservação (AVISE, 2000).

Hohenbergia apresenta grande distribuição na Região Nordeste do Brasil, em especial no que se refere à Floresta Atlântica e Cadeia do Espinhaço (MARTINELLI et al., 2008; VERSIEUX et al., 2008). Devido à plasticidade morfológica o gênero *Hohenbergia* apresenta alguns complexos específicos, como o complexo *ridleyi*. Esse complexo é constituído pelas espécies *H. isepponae*, *H. ramageana* e *H. ridleyi* que apresentam poucas diferenças morfológicas entre si, como por exemplo, o padrão da inflorescência, a forma da espiga e o tamanho das brácteas florais (SIQUEIRA-FILHO; LEME, 2006; GONÇALVES-OLIVEIRA; WANDERLEY, 2017). Além dessas, duas outras espécies são comumente confundidas com *H. ridleyi*, que são: *H. salzmanii* e *H. edmundoi* (GONÇALVES-OLIVEIRA, pers. com.). Em vista disso, existe uma grande dificuldade na diferenciação das espécies, as quais são tratadas por diferentes autores tanto como uma única espécie (BARACHO, 2005; GONÇALVES-OLIVEIRA; WANDERLEY, 2017), como espécies separadas (SIQUEIRA-FILHO, LEME, 2006).

O complexo *ridleyi* tem distribuição longitudinal na Floresta Atlântica, ocorrendo do estado do Rio Grande do Norte até o estado de São Paulo, apresentando dois grandes centros com maior densidade populacional, um entre os estados de Pernambuco, Paraíba e Alagoas e outro no Sul da Bahia (FLORA DO BRASIL, 2020). A coocorrência de populações com morfologia *H. ridleyi* e *H. ramageana* se dá na

região tipo das espécies, no estado de Pernambuco. Ainda nesta região, os citados táxons ocorrem tanto em brejos de altitude quanto na Floresta Atlântica costeira (SIQUEIRA-FILHO; LEME, 2006).

Várias ferramentas moleculares vêm sendo aplicadas para caracterizar a diversidade e a estrutura genética de populações, auxiliando também na resolução de incertezas taxonômicas de espécies e de complexos específicos (e.g. *Olea europaea*, BESNARD et al., 2007; *Vellozia hirsuta*, BARBOSA et al., 2012; *Kielmeyera coriacea*, CADDAH et al., 2013). Uma ferramenta molecular bastante utilizada pelos geneticistas populacionais envolvem os marcadores microssatélites, que compreendem sequências de DNA repetidas em tandem e dispersas no genoma. Em eucariotos, estão presentes no núcleo, no cloroplasto (em plantas) e na mitocôndria (ELLEGREN, 2004; AGARWAL et al., 2008). Os marcadores microssatélites nucleares apresentam natureza codominante, herança mendeliana e um alto grau de polimorfismo. Portanto, tais marcadores podem ser utilizados para avaliar a estrutura genética de populações e na comparação entre espécies relacionadas (NYBOM; WEISING; ROTTER, 2014). Os marcadores plastidiais são haploides, apresentam herança uniparental e geralmente herança maternal em angiospermas, podendo ser utilizados para avaliar a variabilidade dentro e entre populações (TABERLET et al., 1991; OLMSTEAD; PALMER, 1994).

O procedimento mais comumente utilizado para a identificação desses marcadores é a amplificação heteróloga de microssatélites. Este procedimento faz uso de marcadores desenvolvidos para outras espécies próximas, sendo testados em uma amostra piloto da espécie alvo (ZUCCHI et al., 2004; LAVOR et al., 2013; GONÇALVES et al., 2016; ZANELLA et al., 2016). Trata-se de um procedimento que reduz os custos para a caracterização molecular de populações naturais, uma vez que nem sempre há necessidade do desenvolvimento de marcadores espécie-específicos. O presente trabalho fez uso desta estratégia para: (i) realizar a caracterização da diversidade genética de espécies de *Hohenbergia* que pertencem ao complexo *ridleyi*, (ii) identificar os possíveis efeitos dos principais eventos evolutivos que moldaram os membros do complexo, através do acesso à estrutura genética, (iii) testar a coesão de espécies dentro do complexo *ridleyi* através da análise das diferenças genéticas entre os espécimes identificados como *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* e *H. salzmanii*, tendo como hipótese que os espécimes compreendem uma única espécie.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- ✓ Analisar a estrutura genética populacional do complexo *H. ridleyi* em populações de remanescentes de Floresta Atlântica no Nordeste Brasileiro.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar através da amplificação heteróloga marcadores moleculares nucleares e cloroplastidiais polimórficos em *H. ridleyi*
- ✓ Analisar as vias de fluxo gênico histórico entre populações da Floresta Atlântica costeira e brejos de altitude com base nos marcadores moleculares nucleares (nuSSR) e cloroplastidiais (cpSSR).
- ✓ Verificar os níveis de diferenciação genética entre as populações através de análises estatísticas para identificação de populações em divergência no complexo *H. ridleyi*.
- ✓ Correlacionar os dados genéticos com a distribuição geográfica.
- ✓ Identificar *hotspots* de biodiversidade, servindo de parâmetro para o estabelecimento de projetos de conservação da flora nativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA BROMELIACEAE

A família Bromeliaceae apresenta 76 gêneros e aproximadamente 3.652 espécies (GOUDA; BUTCHER, cont. upd.), podendo compreender indivíduos com hábito terrícola, epífita ou saxícola (SMITH; DOWNS, 1974, 1977, 1979). Estudos filogenéticos estimam que o surgimento da família tenha ocorrido no Escudo das Guianas há cerca de 100 milhões de anos, com divergência das espécies em um período relativamente curto, de 15 a 10 milhões de anos (GIVNISH et al., 2011).

A grande maioria das Bromeliaceae é encontrada na região neotropical, sendo que apenas a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr. ocorre na África, tratando-se de um provável evento recente de dispersão de longa distância (CHRISTENHUSZ; CHASE, 2013; PALMA-SILVA; FAY, 2015). Vários são os centros de diversidade da família, sendo que os Andes, o Escudo das Guianas e a Floresta Atlântica brasileira merecem destaque por sua maior diversidade (SMITH; DOWNS, 1974, 1977, 1979; GIVNISH et al., 2011).

Bromeliaceae é formalmente dividida em três subfamílias (Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae), essa classificação é fundamentada em caracteres morfológicos como flores, frutos e sementes (HARMS, 1930; SMITH; DOWNS, 1974, 1977, 1979; SMITH; TILL, 1998). Posteriormente, como resultado de filogenias moleculares a partir do gene *ndhF* e oito *locus* cloroplastidiais, estabeleceu-se uma nova divisão para Bromeliaceae em 8 subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Figura 1) (GIVNISH et al., 2007, 2011).

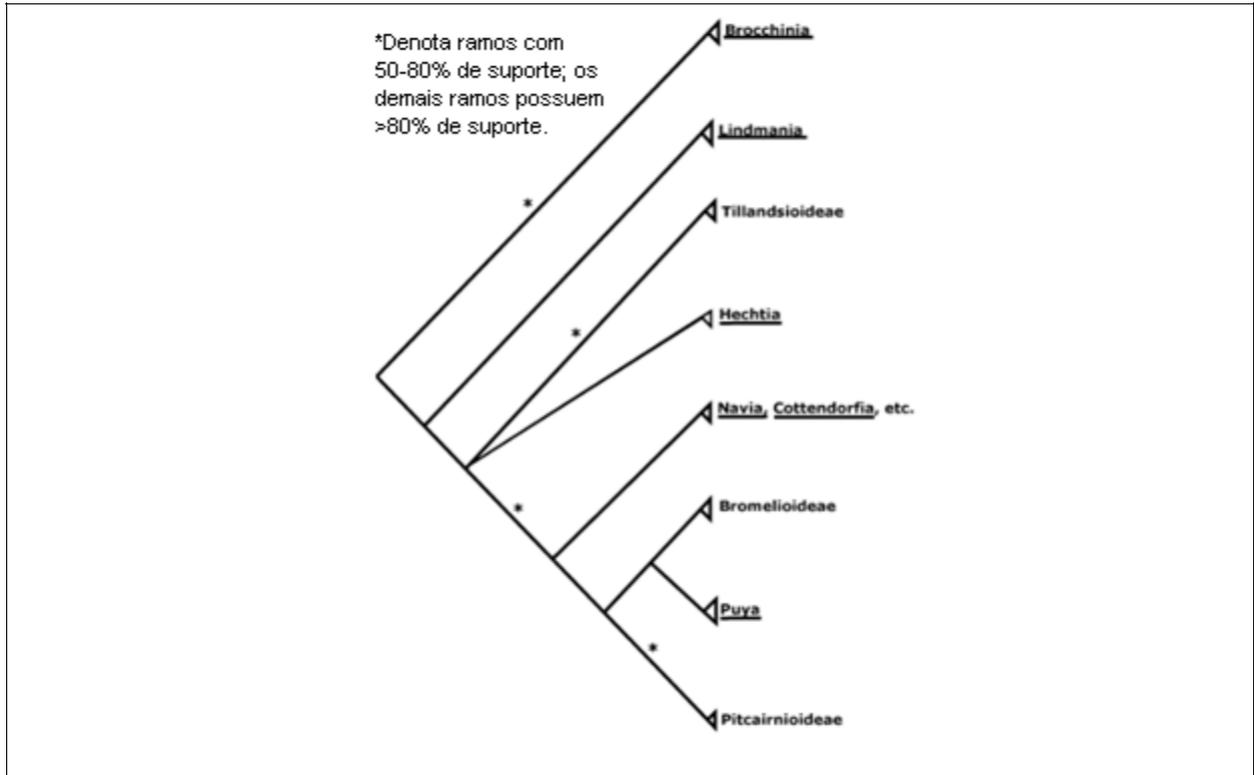


Figura 1- Distribuição filogenética das subfamílias de Bromeliaceae de acordo com classificação realizada por Givnish et al. (2007).

Estudos filogenéticos apontam um grande suporte estatístico para o monofiletismo de Bromelioideae e de Tillandsioideae, enquanto que o grupo das Pitcairnioideae é indicado como parafilético (TERRY et al., 1997; HORRES et al., 2000, 2007; CRAYN et al., 2004; BARFUSS et al., 2005; SCHULTE; BARFUSS; ZIZKA, 2009).

Análises filogenéticas sugerem o monofiletismo da subfamília Bromelioideae, tendo como grupo irmão a subfamília Puyoideae (SCHULTE; BARFUSS; ZIZKA, 2009; JABAILY; SYTSMA, 2010; GIVNISH et al., 2011; SILVESTRO; ZIZKA; SCHULTE, 2014). Estudos filogenéticos moleculares posicionam o ancestral comum de *Puya* e das Bromelioideae há cerca de 13,4 Ma atrás na região dos Andes. Propõe-se que o ancestral de *Puya* divergiu das bromelióides ancestrais há aproximadamente 10,1 Ma. (GIVNISH et al., 2011).

A classificação genérica e subgenérica da subfamília Bromelioideae é altamente problemática, possuindo grande necessidade de revisão, principalmente devido a constantes homoplasias encontradas nos caracteres morfológicos que impedem a separação e a definição das relações entre os grupos (DE FARIA et al., 2004; SCHULTE; BARFUSS; ZIZKA, 2009; SASS; SPECHT, 2010).

Na tentativa de um maior entendimento da filogenia da subfamília Bromelioideae, esta foi dividida em dois grandes clados: “Core Bromelioideae” e os gêneros parafiléticos com as primeiras linhagens que divergiram na história evolutiva (SCHULTE; BARFUSS; ZIZKA, 2009; SASS; SPECHT, 2010). O clado Core Bromelioideae representado pela linhagem mais recente (cerca de 5 Ma.) é composto por espécies epífitas que formam tanques, enquanto o clado correspondente às linhagens irmãs inclui os gêneros *Fascicularia*, *Bromelia*, *Acanthostachys* e *Ananas*, que são geralmente espécies sem tanque, terrícolas ou litófitas (GIVNISH et al., 2007; SASS; SPECHT, 2010). Porém essa delimitação se mostrou altamente problemática e com constantes modificações taxonômicas nas últimas décadas, principalmente em relação às Core Bromelioideae (SILVESTRO; ZIZKA; SCHULTE, 2014; AGUIRRE-SANTORO, 2017).

Estudos filogenéticos apontam para uma semelhança na distribuição geográfica de espécies estreitamente relacionadas de acordo com os caracteres morfológicos, com coocorrência em nível de país ou estado (SASS; SPECHT, 2010). A filogenia em pequenas linhagens das Core Bromelioideae está sendo estudada para facilitar a compreensão do grupo (SASS; SPECHT, 2010; HELLER et al., 2015; AGUIRRE-SANTORO et al., 2016, 2017).

A reconstrução filogenética mais recente para o grupo gerou uma nova classificação suprataxonômica, denominada “Aliança *Ronnbergia*”, que compreende algumas espécies dos gêneros *Aechmea*, *Hohenbergia* e *Ronnbergia* que apareceram como polifiléticas (AGUIRRE-SANTORO et al., 2016). Nessa reconstrução as espécies pertencentes à *Hohenbergia* subg. *Wittmackiopsis* formam agora o gênero *Wittmackia*, juntamente com espécies de *Aechmea* e *Ronnbergia* que são endêmicas da Mata Atlântica central do sudeste do Brasil (AGUIRRE-SANTORO, 2017).

2.1.1 Caracterização da família Bromeliaceae

Bromeliaceae é a segunda família mais representativa das florestas tropicais por possuir inúmeras espécies epífitas (GENTRY; DODSON, 1987; BENZING, 2000). A família é um exemplo de radiação adaptativa, com o surgimento de diversas adaptações dentro do clado, o que possibilitou a colonização de muitos habitats nas florestas tropicais, indo de espaços úmidos a secos (BENZING, 2000; LUTHER; NORTON, 2008; GIVNISH et al., 2011). Por esse motivo, as bromélias são

consideradas bons modelos para a compreensão de como os processos históricos e ecológicos influenciam a macro e a microevolução (HUGHES et al., 2013; GIVNISH et al., 2014; PALMA-SILVA et al., 2016).

As principais características que favoreceram a diversificação em Bromeliaceae são: (1) corpo herbáceo pequeno, (2) hábito rizomatoso, (3) propensão para heterocronia / heterofilia, (4) desenvolvimento de tanques (Fitotelma), (5) tricomas foliares capazes de substituir raízes absorventes e fornecer serviços adicionais (por exemplo, reflectância de luz), (6) propensão para CAM, suculência e outras características xeromórficas (BENZING, 2000). Adicionalmente, merece destaque a variedade de síndromes de polinização e dispersão de sementes que favorecem a conquista de diversos ambientes (VAN DER PIJL, 1982).

As principais características anatômicas encontradas nas Bromeliaceae são: tecidos de armazenamento de água no mesófilo e tricomas foliares especializados que são capazes de capturar água do meio ambiente, podendo suprir a absorção de água pelas raízes (PITA; MENEZES, 2002; CRAYN et al., 2004; GIVNISH et al., 2007, 2011; SCHULTE; BARFUSS; ZIZKA, 2009). Além disso, as bromeliáceas apresentam folhas com filotaxia rosetada que se sobrepõem na base e formam um “tanque” (Fitotelma), onde ocorre o acúmulo de água da chuva e a retenção de material orgânico, permitindo a associação de diversos animais, como por exemplo, anfíbios, insetos e larvas (subfamília Bromelioideae) (BENZING, 2000; VERSIEUX et al., 2008).

Aproximadamente 43% das espécies empregam via fotossintética CAM e 57% C3, existindo uma correlação entre a frequência da via e a elevação da altitude. A maioria das espécies com via C3 apresenta também a maior riqueza e diversidade específica, sendo encontradas em altitudes médias (500-1.500 m) (CRAYN et al., 2015). Isso se deve ao fato de que as altitudes mais e menos elevadas são como fronteiras ambientais, onde estão presentes maiores dificuldades para sobrevivência das plantas, como é o caso dos ambientes xéricos em baixas altitudes onde plantas com via fotossintética CAM apresentam melhor aptidão (COLWELL; HURTT, 1994; JABAILY; SYSTMA, 2012).

A maioria das bromélias apresenta uma relativa conservação para o número básico de cromossomos ($n=25$) e diploidia ($2n=50$), seguido de $2n=48$, principalmente na subfamília Tillandsioideae (MARCHANT, 1967; GITAÍ et al., 2005, 2014).

Espécies de alguns gêneros de Bromeliaceae fogem do padrão estabelecido para a maioria ($2n = 50$), devido a eventos de poliploidização ($2n = 100; 150$), como nas subfamílias Bromelioideae (principalmente em espécies que divergiram precocemente), Pitcairnioideae e Tillandsioideae (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000; GITAÍ et al., 2005; 2014; LOUZADA et al., 2010). Em alguns grupos são observados eventos de displóidia, como para *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. com presença de $2n = 32, 34$ e 36 e para a subfamília Tillandsioideae (especialmente em *Tillandsia*) com $2n = 48$ e número de haplóides $n = 18, 20, 21$ e 22 (RAMÍREZ-MORILLO; BROWN, 2001; BELLINTANI et al., 2005; GITAÍ et al., 2014; NUNES; CLARINDO, 2014). Há alguns poucos relatos de mixoploidia registrada para três espécies do gênero *Pitcairnia* [*P. flammea* ($2n = 50/2n \approx 100$), *P. sceptrigera* ($2n = 50/2n \approx 100$) e *P. breedlovei* ($2n = 48/2n \approx 94$)] (GITAÍ et al., 2014).

Eventos de poliploidização consistem na duplicação total do genoma e estão entre as causas mais comuns de variação nos cariótipos de plantas (GUERRA, 2008; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011). Avaliando a ocorrência de poliploidia em comparação com a filogenia do grupo, notou-se que em Bromeliaceae esse evento ocorreu diversas vezes de forma independente, principalmente em grupos de Bromelioideae que tiveram divergência precoce, de forma que é possível sugerir que a idade filogenética e o habitat, aliados à hibridização, podem ser fatores determinantes para a duplicação dos genomas (GITAÍ et al., 2014).

Com relação à diploidização, o evento pode indicar um processo evolutivo importante em Bromeliaceae, mas precisam ser realizados estudos mais específicos que possibilitem o rastreamento de rearranjos particulares de cromossomos para um maior suporte dessa hipótese (GITAÍ et al., 2014). Por sua vez, os poucos eventos de mixoploidia, foram associados às condições específicas de crescimento da planta sob o cultivo *ex situ* (BAROW; MEISTER, 2003; GITAÍ et al., 2014).

A caracterização citogenética nesse grupo é bastante difícil devido à presença de um grande número de cromossomos de tamanho reduzido e à grande semelhança morfológica entre os mesmos, tratando-se de uma possível fonte de discrepâncias entre resultados de diferentes estudos (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000; PALMA-SILVA et al., 2004; GITAÍ et al., 2005, 2014; CEITA et al., 2008).

2.1.2 Reprodução em Bromeliaceae

A família Bromeliaceae utiliza duas principais estratégias de propagação: via reprodução clonal ou via reprodução sexuada, através da autofecundação e/ou fecundação cruzada (BENZING, 2000; IZQUIERDO; PIÑERO, 2000; SGORBATI et al., 2004; PAGGI et al., 2007; PALMA-SILVA et al., 2008; MATAALLANA et al., 2010; HMELJEVSKI et al., 2015; LOH et al., 2015).

A propagação clonal tem grande influência no fluxo gênico, no estabelecimento de novas populações e na sua dinâmica, bem como na sua diversidade e estrutura genética (STEBBINS, 1957; MCCLINTOCK; WATERWAY, 1993; BENGTSSON, 2003; HMELJEVSKI et al., 2015). Estudos com populações assexuadas de Bromeliaceae apontam para altos níveis de diversidade genética (CAVALLARI et al., 2006; BARBARÁ et al., 2009; LOH et al., 2015) em que o recrutamento de plantas contínuo é o principal colaborador (LOH et al., 2015).

A propagação clonal é uma estratégia fundamental para a manutenção de espécimes em campo e redução da probabilidade de extinção local (PLEASANTS; WENDEL, 1989; BENGTSSON, 2003). Populações assexuadas pequenas com presença de clones heterozigotos e com distribuição restrita podem manter a diversidade genética por mais tempo do que populações sexuada (PLEASANTS; WENDEL, 1989; BALLOUX et al., 2003; LOH et al., 2015).

Através de uma revisão com dados de 248 estudos relacionados à diversidade genotípica de plantas clonais, chegou-se à conclusão de que: (1) a frequência de clonagem aumenta com a idade da população, indicando que a reprodução clonal é limitada por distúrbios; (2) a reprodução clonal é limitada pela dispersão; (3) os clones são mais frequentes em populações de espécies raras ou ameaçadas de extinção; (4) as populações de plantas alienígenas têm frequências mais altas de clonagem; e (5) os clones são mais frequentes nas bordas da distribuição das espécies (SILVERTOWN, 2008).

Em relação ao sistema reprodutivo, aproximadamente 75% das espécies de Bromeliaceae são autocompatíveis, sendo que apenas as subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae apresentam maior quantidade de espécies auto incompatíveis (CANELA; SAZIMA, 2003, 2008; HIETZ et al., 2006; VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006; RAMÍREZ-MORILLO et al., 2009; KAMKE et al., 2011; SCHMID et al., 2011; PAGGI et al., 2012).

Esses padrões contrastam com dois pontos bem estabelecidos: (1) o sistema reprodutivo que prevalece em angiospermas é o de cruzamentos (BAWA et al., 1985);

(2) até o momento, não são conhecidas famílias de angiospermas grandes e antigas nas quais a autofertilização seja o modo predominante de reprodução (IGIC et al., 2008).

A hipótese mais aceita para o surgimento dos sistemas de autocompatibilidade é o seu uso como modo de garantia reprodutiva, como vantagem em casos que a polinização não seja realizada, seja ineficiente ou a densidade populacional seja baixa (BAWA et al., 1985; CUNHA; FISCHER, 2009). Outra hipótese menos aceita pelos pesquisadores é a competição entre espécies próximas que compartilham os mesmos polinizadores e possuem o mesmo período de floração, gerando assim um declínio no sucesso reprodutivo (LEVIN, 1972, 1985; FISHMAN; WYATT, 1999; BELL et al., 2005). Além desse fato, o compartilhamento de polinizadores por espécies próximas aumenta a transferência de pólen heteroespecífico (FISHMAN; WYATT, 1999; SARGENT; ACKERLY, 2008).

A autocompatibilidade é vista como vantajosa apenas devido à garantia reprodutiva. Porém, o fato de esse processo evitar que ocorra a hibridação é um ponto importante para o seu desenvolvimento, uma vez que a progênie híbrida geralmente é menos vigorosa que a progênie autocompatível (LEVIN, 1985; SMITH; RAUSHER, 2007). Existe uma hipótese de que o aumento da autocompatibilidade nas bromélias esteja relacionado com o desenvolvimento de uma barreira pós-zigótica como prevenção da hibridação (MATALLANA et al., 2016).

Sabe-se que a autocompatibilidade reduz o fluxo gênico, gerando uma barreira para a aquisição de adaptações que podem ser fundamentais para a evolução do organismo (FRANKHAM et al., 2002; SCHOEN; BUSCH, 2008). Tendo em vista que as bromélias apresentam grande diversidade nas florestas tropicais, sobretudo naquelas úmidas, essa visão de tendência à extinção de linhagens autocompatíveis não é sustentada para o grupo (MATALLANA et al., 2010, 2016).

2.1.3 Polinização e dispersão em Bromeliaceae

Bromeliaceae é a família que apresenta os mais diversos modos de polinização, podendo ser através da ornitofilia, quiropterofilia, entomofilia, misto, inespecífico e por autogamia (CANELA; SAZIMA, 2008; WENDT et al., 2008). As bromélias ofertam aos polinizadores néctar e dispõem de uma grande variedade de cores, formas e aromas florais que são incrivelmente atrativos (BENZING, 2000).

Há evidências de que a composição e a concentração de açúcar do néctar das Bromeliaceae estão correlacionadas com a síndrome de polinização que cada espécie apresenta (KRÖMER et al., 2008). Plantas polinizadas por morcegos apresentaram néctar rico em hexose e com baixa concentração de açúcar. As polinizadas por beija-flores apresentaram néctar rico em sacarose e com alta concentração de açúcar. Por sua vez, as polinizadas por borboletas apresentaram composição intermediária de sacarose e alta concentração de açúcar. Os principais polinizadores desse grupo são os vertebrados, principalmente beija-flores e morcegos, havendo alguns poucos registros que indicam polinização, mas não efetiva, por abelhas (KAMKE et al., 2011; ZANELLA et al., 2012).

As bromélias apresentam basicamente duas síndromes de dispersão de sementes: zoocoria (dispersão por animais) e anemocoria (dispersão pelo vento). As características mais comuns dos frutos dessa família são: frutos secos com apêndices finamente divididos presentes na subfamília Tillandsioideae (anemocoria), bagas carnudas na subfamília Bromelioideae (zoocoria) e frutos secos com apêndices alados nas seis subfamílias restantes (anemocoria) (GIVNISH et al., 2010).

2.1.4 O gênero *Hohenbergia* Schult.f.

A subfamília Bromelioideae é a maior das Bromeliaceae com relação à quantidade de gêneros (38), sendo a segunda maior com relação ao número de espécies, com aproximadamente 977 espécies (GOUDA; BUTCHER, cont. upd.). Como centros de diversificação destacam-se a Floresta Atlântica e o Cerrado Brasileiro (MYERS et al., 2000; SIMON et al., 2009; GIVNISH et al., 2011).

Este grupo é caracterizado morfológicamente por apresentar folhas serrilhadas, bagas carnudas que são eficazes para dispersão de sementes, ovário ínfero, pétalas quase sempre com apêndices petalíneos, sementes nuas equipadas ou não com apêndices suaves e não ramificados e raízes que se fixam fortemente ao substrato (SMITH; DOWNS, 1979; BENZING, 2000; SAJO, RUDALL; PRYCHID, 2004; GIVNISH, 2007).

A diversificação em Bromelioideae pode ter sido favorecida por duas características principais: a evolução da fisiologia CAM, que promove uma maior economia no gasto de água e conseqüentemente melhor adaptação a ambientes carentes de água (BENZING, 2000); bem como a origem de espécies formadoras de

tanques, que promoveu uma maior adaptação e diversificação específica a ambientes passíveis de vida epifítica (SILVESTRO; ZIZKA; SCHULTE, 2014). Esse sistema possivelmente promoveu uma maior independência de raízes para realizar a absorção de água, uma vez que através dos tanques as plantas dispunham de um sistema alternativo de armazenamento e absorção de água (GRAVENDEEL et al., 2004).

As características citadas anteriormente contribuíram para a diversificação da subfamília Bromelioideae em níveis distintos, figurando a evolução fotossintética CAM como mais importante para a especiação dentro do grupo, ao passo que a capacidade de formação de tanques contribuiu para uma menor taxa de extinção (VAMOSI; VAMOSI, 2011; SILVESTRO; ZIZKA; SCHULTE, 2014).

Alguns caracteres morfológicos que definem clados relativamente grandes e que surgem repetidamente na filogenia atual podem ser importantes na evolução e divergência das Bromelioideae (SASS; SPECHT, 2010). Alguns exemplos desses caracteres são a presença de inflorescência simples em *Aechmea* subgênero *Pothuava*, brácteas florais que formam bolsas distintas em *Aechmea* subgênero *Platyaechmea*, inflorescência em espigões estrobilados em *Hohenbergia* e inflorescências glabras em *Aechmea* subgênero *Lamprococcus* (SASS; SPECHT, 2010). O significado adaptativo dessas características está correlacionado com a atração de diversos tipos de polinizadores aviários, principalmente beija-flores (GIVNISH et al., 2014).

O gênero *Hohenbergia* é composto por aproximadamente 49 espécies (GOUDA; BUTCHER, cont. upd.), das quais 48 ocorrem exclusivamente no Brasil (FORZZA et al., cont. upd.). A maioria das espécies brasileiras é endêmica do Nordeste, com grande diversidade no estado da Bahia (GONÇALVES-OLIVEIRA; WANDERLEY, 2017).

Do ponto de vista morfológico, o gênero *Hohenbergia* se caracteriza por apresentar inflorescências compostas com ramos primários pedunculados, flores fortemente comprimidas formando espigas estrobiladas, presença de apêndices petalíneos e pétalas azul arroxeadas (SMITH; DOWNS, 1979; RAMÍREZ-MORILLO, 2010). O gênero *Hohenbergia* compartilha inúmeros aspectos relacionados à morfologia, ecologia e hábito com espécies do gênero *Aechmea* (SMITH; DOWNS, 1979; SCHULTE; BARFUSS; ZIZKA, 2009).

Alguns caracteres plesiomórficos apresentados pelas *Hohenbergia* apontam para uma divergência recente do gênero, como a presença de espécies de grande porte, escapo floral desenvolvido e lanuginoso, hábito facultativo, folhas coriáceas extremamente espinhosas e grande produção de flores (SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 1998).

Anteriormente, o gênero *Hohenbergia* foi subdividido em dois subgêneros: (1) *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* que apresenta ocorrência no Brasil, principalmente no Nordeste onde apresenta dois centros de maior diversificação, um na Cadeia do Espinhaço (BA) e outro na Floresta Atlântica; (2) *Hohenbergia* subg. *Wittmackiopsis* com 19 espécies descritas que ocorrem na região do Caribe (incluindo Venezuela e Colômbia). A única espécie que ocorre nessas duas regiões é *Hohenbergia stellata* (SMITH; DOWNS, 1979; AGUIRRE-SANTORO, 2017).

No entanto, estudos filogenéticos recentes propuseram uma recircunscrição taxonômica do grupo, de modo que o antigo subgênero *Wittmackiopsis* foi reestabelecido à condição de gênero, sendo utilizado o antigo nome de *Wittmackia* (AGUIRRE-SANTORO, 2017). As chances de incluir *Hohenbergia* subg. *Hohenbergia* em *Wittmackia* são baixas, pois o subgênero *Hohenbergia* possui algumas características exclusivas que permitem sua distinção como, por exemplo, a presença de longos apêndices de óvulos caudados, inflorescências divididas em três, além de pétalas de cor vermelha, azul e roxo-escuro (AGUIRRE-SANTORO, 2017).

O conhecimento da diversidade das espécies brasileiras de *Hohenbergia* ainda é insuficiente, porém novas espécies vêm sendo descritas ultimamente: *H. lativaginata* J.R. Maciel & Louzada (MACIEL; LOUZADA, 2014) e *H. isepponae* R. Oliveira & Wand (GONÇALVES-OLIVEIRA; WANDERLEY, 2017).

A grande plasticidade morfológica do gênero dificulta a clareza e delimitação taxonômica entre as espécies, levando à formação de complexos específicos, incluindo o complexo *ridleyi*.

2.1.4.1 Complexo *ridleyi*

Hohenbergia ridleyi (Baker) Mez é a principal espécie do complexo, sendo característica da Floresta Atlântica. Apresenta distribuição longitudinal desde o Rio Grande do Norte como limite Norte a São Paulo como limite Sul (SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 1998; FLORA DO BRASIL, 2020). Possui hábito de vida epifítico

facultativo, com preferência de fixação em espécies de árvores adultas que geralmente apresentam a casca do tronco rugosa para facilitar a fixação e formação de novas colônias (SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 1998).

É caracterizada por apresentar um escapo floral vistoso e lanuginoso; inflorescência piramidal, ramificada e com espigas estrobiladas; flores pequenas abundantes, lilases, actinomorfas, tubulosas, hermafroditas e, diferentemente das demais espécies de Bromeliaceae, *H. ridleyi* é autoincompatível (SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 1998; MATAALLANA et al., 2010).

A estratégia de floração é a cornucópia, que corresponde à produção de flores ao longo de algumas semanas (GENTRY, 1974; SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 1998). Essa estratégia permite o acesso de uma grande diversidade de polinizadores que apresentam diferentes estratégias de forrageamento (SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 1998).

A síndrome floral de *H. ridleyi* é a melitofilia, porém ocorrem visitas de vários outros polinizadores, como por exemplo, beija-flores e borboletas (SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 1998). Os polinizadores mais frequentes nas flores de *H. ridleyi* no estudo de Siqueira-Filho & Machado (1998) foram abelhas de médio porte, como *Euglossa cordata* e *Melipona scutellaris*. Porém, os autores afirmam que o sucesso na polinização não está relacionado ao tamanho da abelha. Segundo Gardner (1986), a flexibilidade de polinização pode indicar um ajuste ao tipo de polinizador, fator considerado importante no sucesso reprodutivo e evolutivo do grupo.

Duas espécies, *H. isepponae* R. Oliveira & Wand e *H. ramageana* Mez, apresentam características morfológicas e fenológicas (*H. ramageana*; SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 2004) que se assemelham significativamente à *H. ridleyi*, de forma a compor o complexo específico (Figura 2) (GONÇALVES-OLIVEIRA; WANDERLEY, 2017). Algumas das diferenças entre as espécies desse complexo são: o padrão da inflorescência, a forma da espiga e o tamanho das brácteas florais (Figura 3) (SIQUEIRA-FILHO; LEME, 2006). Existe uma grande dificuldade na diferenciação das espécies levando até mesmo a identificações errôneas devido à falha na escolha de caracteres nas descrições e uso de chave artificial fornecida por Smith & Downs (1979) (SIQUEIRA-FILHO; LEME, 2006; GONÇALVES-OLIVEIRA; WANDERLEY, 2017).



Figura 2- Registros fotográficos do complexo ridleyi. Fotos: Rodrigo Oliveira.

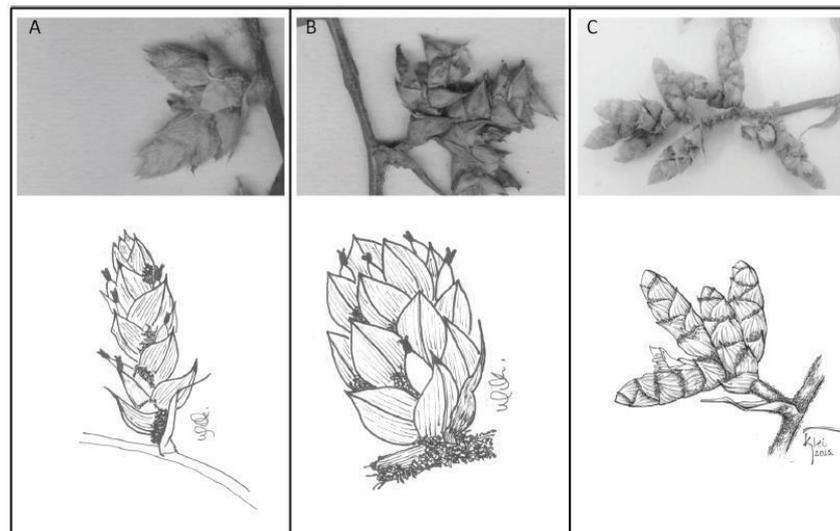


Figura 3- Ilustrações dos ramos das inflorescências das espécies representativas do complexo ridleyi, sendo **A.** *H. ridleyi* (Baker) Mez, **B.** *H. ramageana* Mez e **C.** *H. isepponae* R. Oliveira & Wand. Adaptado de Gonçalves-Oliveira & Wanderley (2017).

2.2 FLORESTA ATLÂNTICA

A Floresta Atlântica é considerada a segunda maior floresta pluvial do continente americano e um dos 25 hotspots mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Originalmente, a Floresta Atlântica cobria mais de 1,5 milhões de km², sendo 92% desta área localizada no Brasil com distribuição contínua ao longo da costa brasileira chegando ao Paraguai e até a Argentina como limite sul (MORELLATO; HADDAD, 2000).

A história da Floresta Atlântica foi marcada por fortes oscilações climáticas durante o Pleistoceno que levaram a constantes momentos de expansão e contração, tanto da Floresta Atlântica como do Cerrado. Essas oscilações causaram uma grande mudança vegetacional de forma que afetou a continuidade e extensão desses biomas (PENNINGTON et al., 2004; ANTONELLI et al., 2009; HOORN et al., 2010; ANTONELLI; SANMARTÍN, 2011). Por exemplo, as bromélias sem tanque apresentaram altas taxas de extinção no período de aridificação, enquanto as formadoras de tanque foram menos afetadas devido à sua capacidade de encontrar abrigo em ambientes mais favoráveis, como a Floresta Atlântica (SIMON et al., 2009; SILVESTRO; ZIZKA; SCHULTE, 2014).

Compreendendo elevações que variam desde o nível do mar até 2.900m, a Floresta Atlântica apresenta grande variação no tipo e profundidade dos solos, assim como na temperatura média e nos índices de pluviosidade, que variam de 4.000 mm a 1.000 mm (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; MANTOVANI, 2003). A maioria dos estudos aponta uma correlação entre o aumento da riqueza de espécies e heterogeneidade ambiental em termos de temperatura e disponibilidade de água (PAUSAS; AUSTIN, 2001). Várias formações encontram-se associadas ao bioma, como mangues, restingas, formações campestres e brejos de altitude (TABARELLI et al., 2005).

Embora aproximadamente 15% de sua área persistam, os fragmentos da Floresta Atlântica apresentam elevada riqueza e diversidade de espécies, abrigando 20.000 espécies de plantas vasculares, sendo 8.000 endêmicas (MYERS et al. 2000; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2017). Apresenta uma das maiores porcentagens de espécies endêmicas distribuídas em pelo menos cinco áreas com base na distribuição de vertebrados terrestres e plantas no Brasil: Brejos Nordestinos, Pernambuco, Bahia Central, Costa da Bahia e Serra do Mar (SILVA; CASTELETI, 2003; RODRIGUES, 2005).

O desmatamento contínuo e crescente é um fator extremamente preocupante. No período de 2015-2016, por exemplo, houve um acréscimo de 57,7% de áreas da Floresta Atlântica desmatadas comparativamente ao ano anterior (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2017). Além de causar a destruição de inúmeras populações, o desmatamento reduz a diversidade genética e dificulta o fluxo gênico entre as populações existentes devido à grande fragmentação das áreas florestais (BROWN; BROWN, 1992). Essa destruição intensa leva à perda da diversidade

endêmica, assim como, pode rapidamente apagar registros dos processos históricos, impedindo a compreensão completa dos mecanismos subjacentes ao endemismo local e, portanto, dificultando medidas de conservação mais efetivas (CARNAVAL et al., 2009).

A Floresta Atlântica é considerada um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae, apresentando 803 espécies de bromélias, sendo 653 endêmicas, das quais 40% correm risco de extinção (MARTINELLI et al., 2008). Dessa forma, a preservação da Floresta Atlântica é vital para a conservação da diversidade da família Bromeliaceae.

Algumas áreas de endemismo, como Pernambuco, agora possuem menos de 5% de sua floresta original (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003). A floresta desse centro endêmico recebe grande influência da Floresta Amazônica e Floresta Atlântica do sul e sudeste do Brasil, de forma que apresenta uma grande distinção do restante da Floresta Atlântica brasileira (ANDRADE-LIMA, 1960, 1982; PRANCE, 1982). Sua composição apresenta mais de 50% de todas as aves presentes na Floresta Atlântica brasileira e cerca de 8% das espécies de plantas lenhosas. Diversas espécies são endêmicas do centro de endemismo Pernambuco, com destaque para orquídeas, com sete espécies endêmicas (PESSOA; ALVES, 2015), bem como para as bromélias, onde 45,5% dos 93 táxons registrados são considerados endêmicos (SIQUEIRA-FILHO et al., 2006).

Carnaval et al. (2009) trazem um alerta para a necessidade de maior atenção para a região de endemismo central (Pernambuco), pois a maioria dos estudos moleculares e conservacionistas estão voltados para a o sul e sudeste do Brasil (MORELLATO; HADDAD, 2000; SILVA; TABARELLI, 2000; RODRIGUES, 2005). Os autores acreditam que a diversidade genética e o endemismo desse centro de endemismo foram subestimados. Tal fato é agravado pelos altos índices de desmatamento da região, temendo-se que a diversidade possa ser perdida antes mesmo de seu estudo e caracterização (SILVA; TABARELLI, 2000; RODRIGUES, 2005).

Existem inúmeros estudos de bromélias na Floresta Atlântica, devido especialmente à grande representatividade da família nessa região (ZANELLA et al., 2012; PAGGI et al., 2015; GOETZE et al., 2016a,b; MENDES et al., 2016; SHEU et al., 2017). Entretanto, assim como para outros grupos vegetais, a maioria dos estudos

sobre a família Bromeliaceae vem sendo realizados no sudeste do Brasil (ZANELLA et al., 2012).

Zanella et al. (2012) constataram em sua revisão que poucos estudos relacionados à diversidade genética das populações de bromélias foram realizados na Floresta Atlântica. Além disso, é difícil estabelecer uma comparação dos parâmetros da diversidade genética dessas populações devido aos níveis variáveis de polimorfismos que cada marcador consegue detectar (ZANELLA et al., 2012).

Dentro de formações semiáridas do Nordeste Brasileiro, estão presentes os brejos de altitude, também conhecidos como brejos nordestinos ou matas serranas, são florestas úmidas cercadas por uma vegetação de caatinga (CÂMARA, 2003; ANDRADE-LIMA, 2007). Os brejos são ilhas de florestas em regiões com precipitação média anual de 240-900 mm e planaltos e chapadas que alcançam até 1.100 m de altitude, onde as chuvas orográficas garantem níveis elevados de precipitação, em torno de 1.200 mm/ano (Figura 4) (ANDRADE-LIMA, 1960, 1961). Essas áreas apresentam condições privilegiadas no que diz respeito à umidade do solo e do ar, temperatura e cobertura vegetal, quando comparados às regiões semiáridas circundantes (ANDRADE-LIMA, 1966; RIBEIRO et al., 2009).

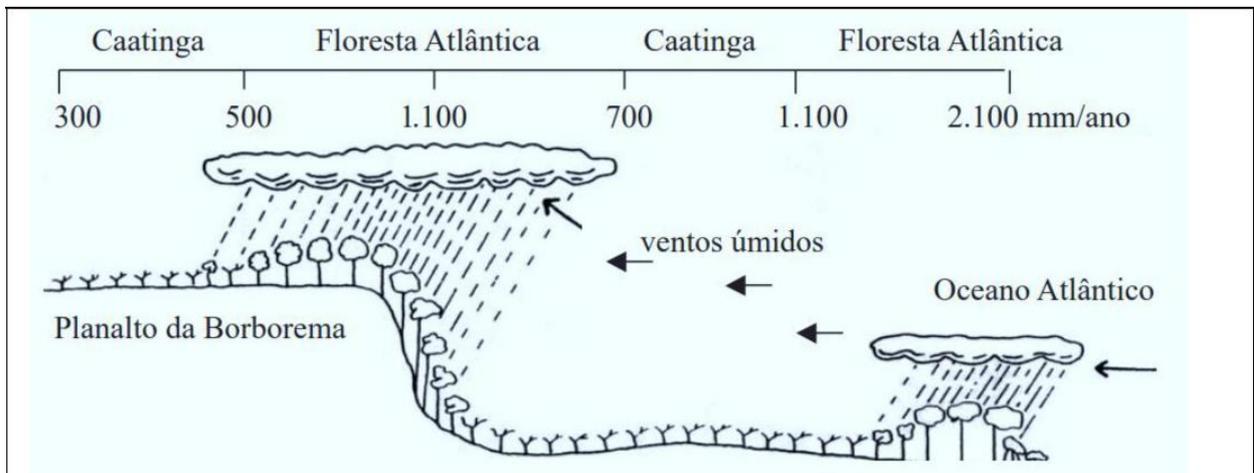


Figura 4- Ilustração esquemática dos brejos de altitude no Nordeste brasileiro. Adaptado de Mayo & Fevereiro (1982) e Tabarelli & Santos (2004).

Originalmente, os brejos correspondiam a uma área de aproximadamente 18.500 km², porém eles foram drasticamente reduzidos e de acordo aos últimos dados restam apenas 2.626,68 km² da vegetação original (SOS MATA ATLÂNTICA, 1993; TABARELLI; SANTOS, 2004). Os brejos de altitude que se destacam são os de Taquaritinga do Norte, Serra Negra de Bezerros, Camocim de São Félix, Serra dos

Cavalos em Caruaru, serras em Belo Jardim e Sanharó, Serra do Ororobá em Pesqueira, serras em Garanhuns, serra Negra entre os municípios de Inajá e Floresta, serra de Tacaratu e de Triunfo (ANDRADE-LIMA, 2007). Por vezes, os brejos estabelecem continuidade com florestas úmidas costeiras, como por exemplo, com a floresta da serra de Garanhuns (ANDRADE-LIMA, 2007).

Quando comparado com as demais regiões endêmicas da Floresta Atlântica, os Brejos Nordestinos apresentam alto índice de riqueza natural, porém, estão presentes apenas três unidades de conservação com menos de 12% da área protegida e 0% de qualidade de proteção (SILVA; CASTELETTI, 2003). Devido à presença de um alto índice de floresta natural e baixo índice de proteção da biodiversidade faz-se necessária e urgente a criação não apenas de novas unidades de conservação nessas áreas, mas também de reservas que sejam mais abrangentes (maiores que 50 km²) (SILVA; CASTELETTI, 2003).

Diversos levantamentos e estudos do estado de conservação da biodiversidade dos brejos de altitude foram realizados, tanto relacionados à flora (FERRAZ et al., 1998; CAVALCANTI; TABARELLI, 2004; PÔRTO; GERMANO; BORGES, 2004; SANTIAGO; BARROS; SYLVESTRE, 2004; RODAL et al., 2005), como a fauna (ROSA; GROTH, 2004; SOUSA; LANGGUTH; AMARAL, 2004; PEREIRA FILHO; MONTINGELLI, 2011) como também aos recursos hídricos (BRAGA et al., 2002; CABRAL et al., 2004). Foram relatadas algumas espécies como endêmicas dos brejos, como por exemplo, mamíferos das espécies *Noctilio albiventris* e *Myotis ruber* e briófitas representantes das famílias Meteoriaceae, Brachytheciaceae e Phyllogoniaceae comparando com a brioflora presente no estado de Pernambuco (PÔRTO; GERMANO; BORGES, 2004; SOUSA; LANGGUTH; AMARAL, 2004).

A diversidade genética das populações dos brejos ainda é pouco estudada (PINHEIRO et al., 2012; FERREIRA-NETO et al., 2017). Usando marcadores SSR e ISSR, Dantas et al. (2015) analisaram a diversidade genética de *Podocarpus sellowii*, uma gimnosperma com populações extremamente restritas incluindo três populações conhecidas em brejos de altitude. As populações apresentaram baixa diversidade genética e alta diferenciação entre o Brejo de Baturité e os demais. Esse resultado já era esperado pelos autores devido à presença de poucos indivíduos adultos, à grande pressão antrópica e ao isolamento entre brejos desde o Pleistoceno (DANTAS et al., 2015).

Os brejos de altitude estão sendo altamente impactados pela ação antrópica desde o século XIX, tanto pela caça de vertebrados como pelos constantes desmatamentos das florestas para uso seletivo de plantas (madeiras, bromélias e plantas medicinais) e uso indiscriminado das terras para agricultura, com extensas lavouras de café, banana e culturas de subsistência (milho, feijão e mandioca) (LINS, 1989; PÔRTO; GERMANO; BORGES, 2004; ANDRADE-LIMA, 2007). Além disso, apenas 0,54% dos brejos de altitude encontram-se “protegidos” por unidades de conservação que carecem de melhor distribuição e administração (SIQUEIRA-FILHO, 2004). Dessa forma, a necessidade de conservação dessas áreas peculiares é considerada prioritária, pois além de serem ilhas isoladas apresentam uma extensa biodiversidade que ainda é pouco conhecida (BRASIL-MMA, 2000).

Poucos estudos relacionados com a família Bromeliaceae foram realizados nos brejos de altitude (SIQUEIRA-FILHO, 2004; SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 2004). Siqueira-Filho (2004) observou uma alta representatividade de bromélias em seu inventário realizado nos brejos de altitude de Pernambuco, registrando 46 espécies pertencentes a 15 gêneros, das quais 32,6% são restritas aos brejos. Um fator alarmante é que apenas 4% das bromélias foram classificadas com baixo risco de extinção, sendo a maioria (32%) presumivelmente ameaçada e 7% criticamente em perigo, evidenciando a necessidade urgente de conservação das bromélias nessas áreas (SIQUEIRA-FILHO, 2004).

2.3 MARCADORES MOLECULARES

O surgimento dos marcadores genéticos ocorreu no século XIX, quando Gregor Mendel empregou tais polimorfismos com base em caracteres fenotípicos (BARRANDEGUY; GARCÍA, 2014). Com o decorrer dos anos os marcadores foram se aperfeiçoando e, de sua origem morfológica, transitaram para bioquímica até chegar aos marcadores baseados em polimorfismos de sequências de DNA (BARRANDEGUY; GARCÍA, 2014).

Os marcadores moleculares são regiões facilmente reconhecíveis que marcam a diversidade e localização de determinadas sequências, incluindo genes (CHATTERJEE et al., 2015). Tais marcadores são considerados uma importante ferramenta para analisar polimorfismos em sequências de DNA que ocorrem naturalmente nos indivíduos, possibilitando também a obtenção de informações da

evolução molecular através de seus padrões de variação e divergência (BURR, 1994; AVISE, 2012). Dessa forma, os marcadores são utilizados para abordar questões controversas ou para analisar problemas de história e evolução naturais que estão fora do alcance da observação não-molecular tradicional (AVISE, 2012).

Os marcadores podem pertencer a duas categorias: bioquímicos ou de DNA. Os marcadores bioquímicos, como as aloenzimas, captam mutações no DNA resultantes em mudanças de aminoácidos. Essa técnica apresenta a vantagem de ser simples, de baixo custo e de gerar marcadores codominantes com alta reprodutibilidade (SINGH et al., 2010). Por outro lado, o produto desses marcadores é pouco abundante e com níveis polimórficos baixos, além de não ser completamente neutro, podendo ser afetado pelas condições ambientais (SINGH et al., 2010).

Os marcadores de DNA apresentam diferentes propriedades e podem ser detectados por duas técnicas: através de hibridização ou pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Alguns exemplos desses marcadores são:

- Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP);
- Minissatélites ou número variável de repetições em tandem – *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR);
- Sequências simples repetidas – *Simple Sequence Repeat* (SSR);
- Amplificação randômica de DNA polimórfico – *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD);
- Polimorfismo de tamanho amplificado – *Amplified Length Polymorphism* (AFLP);
- Sequências internas simples repetidas – *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR);
- Polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) – *Single Nucleotide Polymorphism* (SINGH et al., 2010; CHATTERJEE et al., 2015).

A escolha do marcador varia de acordo com o objetivo da pesquisa, devendo-se levar em conta as propriedades e benefícios que cada marcador oferece (SINGH et al., 2010). Na tabela 1 estão listados os quatro marcadores detectáveis por PCR mais comumente utilizados.

Tabela 1- Comparação entre os marcadores detectáveis por PCR mais comumente utilizados. Adaptado de Mueller & Wolfenbarger (1999), Semagn; Bjørnstad; Ndjiondjop (2006) e Singh et al. (2010).

Característica	SSR	RAPD	AFLP	ISSR
Abundância genômica	Média	Muita alta	Muito alta	Média
Necessidade/ qualidade de DNA	Baixa/Média	Baixa/Baixa	Baixa/Alta	Baixa/Média
Herança	Codominante	Dominante	Dominante	Dominante
Nível de polimorfismo	Alto	Alto	Muito alto	Alto
Reprodutibilidade	Alta	Intermediária	Alta	Média-alta
Deteção de alelos	Sim	Não	Não	Não
Resolução de diferenças genéticas	Elevada	Moderada	Elevada	Moderada- elevada
Custo	Alto	Baixo	Médio-alto	Baixo

Marcadores moleculares são bastante utilizados em estudos populacionais, como por exemplo, (1) marcadores AFLP aplicados na filogenia do grupo “Aliança *Aechmea*” (HELLER et al., 2015) ou na filogenia de *Dyckia* (PINANGÉ et al., 2016); (2) ISSRs na diversidade genética de *Hypericum perforatum* (FAROOQ et al., 2014); e (3) marcadores SSR e SNP na diversidade genética e estrutura populacional de *Vitis vinifera* (EMANUELLI et al., 2013). Estudos realizados na família Bromeliaceae apresentam grande utilização de marcadores codominantes para esse tipo de análise, sendo os microsatélites os mais utilizados (ZANELLA et al., 2012; FENG et al., 2013; CASCANTE-MARÍN et al., 2014; LOH et al., 2015; GOETZE et al., 2016a; GONÇALVES-OLIVEIRA et al., 2017).

2.3.1 Microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos por repetições curtas em tandem (STRs - *Short Tandem Repeats*) ou sequências simples repetidas (SSRs), são sequências nucleotídicas curtas com geralmente dois a seis pares de bases que se repetem consecutivas vezes (BHARGAVA; FUENTES, 2010). De acordo com sua localização,

os microssatélites podem ser classificados como nucleares (nuSSR), cloroplastidiais (cpSSR) presentes em vegetais, ou mitocondriais (mtSSR) (KALIA et al., 2011).

A densidade dos microssatélites tende a se correlacionar positivamente com o genoma, sendo que o genoma de mamíferos apresenta maior densidade entre os genomas completamente sequenciados (HANCOCK, 1996; TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000; ELLEGREN, 2004). Diferentemente dos demais organismos, a densidade de microssatélites no genoma das plantas está correlacionada negativamente com o tamanho do genoma, devido à baixa densidade de microssatélites nas regiões que estão envolvidas na expansão do genoma (por exemplo, nos retrotransposons). A maior frequência dos microssatélites nas plantas está localizada nas regiões transcritas, especialmente nas porções não traduzidas (MORGANTE; HANAFEY; POWELL, 2002).

Os microssatélites são considerados marcadores altamente informativos devido a diversas características que apresentam, como por exemplo, natureza multialélica, herança codominante, pequeno comprimento, grande dispersão e constante frequência ao longo de todo DNA genômico dos eucariotos (POWELL et al., 1996). Tais características garantem a ampla utilização desses marcadores gênicos em diversos campos de estudo, incluindo geração de perfis genéticos (*fingerprinting*), identificação parental, mapeamento genético, conservação e genética populacional (BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006; CHISTIYAKOV et al., 2006; BHARGAVA; FUENTES, 2010; GUICHOUX et al., 2011).

Esses marcadores são amplamente utilizados em estudos evolutivos e populacionais, visto que a herança uniparental presente nos microssatélites cloroplastidiais juntamente com a herança biparental dos nucleares permitem uma complementariedade para análises de variações genômicas em plantas e de fluxo gênico em populações naturais (POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996; PROVAN; POWELL; HOLLINGSWORTH, 2001; KALIA et al., 2011).

As regiões flanqueadoras dos microssatélites são bastante conservadas, de modo que é possível a síntese de *primers* para sua amplificação por PCR (CHISTIYAKOV et al., 2006). Devido à necessidade de síntese de *primers*-específicos essa técnica torna-se cara e demanda muito tempo para o estabelecimento desses marcadores espécie-específicos (ZANE et al., 2002; SQUIRRELL et al., 2003). Em vista do exposto, com intuito de reduzir os custos da técnica e facilitar o uso dos microssatélites, *primers* desenvolvidos para uma determinada espécie podem ser

transferidos para outras espécies relacionadas. Como esperado, quanto mais relacionados forem os organismos maior será o sucesso na transferência e amplificação específica dos marcadores (PRIMMER; MERILÄ, 2002; CHENG et al., 2012).

A transferência dos *primers* microssatélites é possível pois além das regiões flangeadoras serem bastante conservadas, muitas vezes tais regiões são conservadas entre diversos organismos (OLIVEIRA et al., 2006). Registros desse tipo de transferência apresentaram bons resultados em estudos com animais (LILLANDT et al., 2002; DUFRESNES et al., 2014; TOKUDA; MARTINS; IZAR, 2014) e plantas (MÉTAIS et al., 2002; ZUCCHI et al., 2003; FAGUNDES et al., 2016), como também em espécies pertencentes ao mesmo gênero (FRANÇA et al., 2015; DUBÉ et al., 2017; RAI et al., 2017) e a gêneros distintos (SAHU et al., 2015; DISASA et al., 2016; CHOUDHARY et al., 2017).

As repetições nucleotídicas ou motivos microssatélites apresentam variação considerável de acordo com o organismo em que está presente; por exemplo, as plantas apresentam maior frequência de trinucleotídeos, seguido dos di- e tetranucleotídeos. Por sua vez, os fungos Polyporales apresentaram grande frequência de mononucleotídeos (TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000; VARSHNEY et al., 2002, 2005; ZHANG et al., 2015).

A composição das unidades de repetição também varia de acordo com o organismo, sendo o motivo (AC)_n um dos mais frequentes nos vertebrados, enquanto o motivo (AT)_n figura como um dos mais frequentes em plantas (LAGERCRANTZ; ELLEGREN; ANDERSSON, 1993; TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000). Além disso, existe uma diferença entre a presença desses motivos em regiões codificantes e não-codificantes, de forma que nas regiões não codificantes todos os tipos de repetições de microssatélites (mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleótídeos) são encontrados em excesso enquanto nas regiões codificantes as repetições tri e hexanucleótídeos são mais frequentes (METZGAR; BYTOF; WILLS, 2000). Esse fato pode ser explicado pela pressão seletiva exercida mais fortemente nas regiões codificantes devido à sua importância funcional. Sendo assim, os SSRs podem fornecer uma base molecular para uma rápida adaptação às mudanças ambientais tanto em procarionotos como em eucariotos (METZGAR; BYTOF; WILLS, 2000; LI et al., 2002).

Através do uso desse marcador comprimentos distintos de sequências podem ser identificados no produto amplificado, os quais estão relacionados com a

quantidade de repetições nucleotídicas que o *locus* apresenta. Essa variação possivelmente é causada por deslizamento da polimerase durante o processo de replicação do DNA ou ainda devido à ocorrência de crossing-over desigual (BURR, 1994).

A classificação dos microssatélites é feita através do tipo de sequência da repetição, podendo apresentar quatro tipos: perfeito, imperfeito, perfeito composto ou imperfeito composto (OLIVEIRA et al., 2006; KAVAKIOTIS et al., 2014). O microssatélite é considerado: (1) perfeito quando não apresenta bases que não pertençam ao motivo ao longo da sequência, por exemplo, como na sequência ATGCATGCATGCATGC ou (ATGC)₄; (2) imperfeito quando apresenta uma ou mais bases que não pertencem ao motivo da sequência, por exemplo, (ATGC)₄G(ATGC)₅; (3) perfeito composto quando apresenta duas ou mais sequências perfeitas, como na sequência (ACGC)₄(GCCA)₃; e (4) imperfeito composto quando apresenta duas ou mais sequências imperfeitas (OLIVEIRA et al., 2006).

Além disso, os microssatélites podem ser neutros no genoma ou apresentar diferentes funções de acordo com a espécie em que ocorre e à composição da sua repetição. Alguns exemplos das variáveis atividades dos microssatélites são: regulação e/ou funcionamento dos genes, patogenicidade, variabilidade genômica nos microrganismos, organização da cromatina, recombinação, replicação do DNA, ciclo celular e sistema de reparo incompatível, entre outras (LI et al., 2002; BAGSHAW, 2017).

Marcadores SSR são amplamente utilizados em estudos de conservação com membros da família Bromeliaceae, tanto no desenvolvimento e transferência de *primers* (SARTHOU et al., 2003; PALMA-SILVA et al., 2007; PAGGI et al., 2008; WÖHRMANN et al., 2012; HMELJEVSKI et al., 2013; AOKI-GONÇALVES et al., 2014) como em estudos populacionais, analisando fluxo gênico (HMELJEVSKI et al., 2014; LEXER et al., 2016) ou a estruturação e a variabilidade gênica (CASCANTE-MARÍN et al., 2014; GOETZE et al., 2015, 2016a; GONÇALVES-OLIVEIRA et al., 2017).

2.4 GENÉTICA DE POPULAÇÕES EM BROMELIACEAE

A conservação vegetal trata-se de uma prioridade humana, visto que as plantas são essenciais para a manutenção da vida na Terra (MAXTED; FORD-LLOYD; HAWKES, 2013). Atualmente 46 a 60% das espécies vegetais estão listadas como

ameaçadas ou em risco de extinção, o que torna a necessidade de ações de conservação ainda mais urgentes (MYERS et al., 2000; PITMAN; JØRGENSEN, 2002).

Para a conservação de uma determinada espécie é necessário que se tenha conhecimento da sua história de vida. O material básico de todas as mudanças evolutivas são os genes, que mantêm registrados em sua estrutura todos os eventos ocorridos no passado. Sendo assim, a conservação de espécies implica na conservação do resultado de um processo evolutivo registrado na estrutura genética das populações (LOESCHCKE et al., 2013).

Na década de 70, os filogeneticistas discutiram sobre a necessidade de serem realizados mais estudos genéticos populacionais com plantas, assim como a necessidade de estabelecer uma orientação do problema com perguntas sólidas (LEWONTIN et al., 1974). Após isso, vários cientistas se dedicaram intensivamente ao entendimento dos padrões genéticos existentes nas populações de plantas, tendo como principal mecanismo o uso de marcadores isoenzimáticos (JAIN, 1976; GOTTLIEB, 1977; BROWN, 1978, 1979).

O primeiro estudo que avaliou a estrutura genética de populações de Bromeliaceae foi realizado por Soltis et al. (1987) com duas espécies do gênero *Tillandsia*. Através do uso de eletroforese de isoenzimas, os autores encontraram altos níveis de autogamia e heterogeneidade genética entre as populações da espécie *T. recurvata*, enquanto a espécie *T. ionantha* apresentou um baixo nível de autogamia e baixa variação de frequência de alelos entre as populações. Posteriormente, outros estudos foram realizados com o uso de isoenzimas (SARTHOU; SAMADI; BOISSELIER-DUBAYLE, 2001, GONZALEZ-ASTORGA, 2004), como também com outros marcadores moleculares (CAVALLARI et al., 2006; SHEU et al., 2017).

Na subfamília Bromelioideae os primeiros estudos genéticos realizados estavam voltados para a identificação e taxonomia das espécies do gênero *Ananas* através de análises dos polimorfismos de isoenzimas (DEWALD et al., 1988, 1992). Posteriormente um outro trabalho investigou a relação genética entre quatro espécies do gênero *Aechmea*, com o uso de aloenzimas (IZQUIERDO; PIÑERO, 1998). Atualmente os marcadores microssatélites são utilizados para diversos fins, tanto para análises da estrutura e diversidade genética, quanto em filogenia, fluxo gênico, entre outros (ZHANG; HEWITT, 2003; KRAPP et al., 2014; LAVOR et al., 2014; LEXER et al., 2016; GOETZE et al., 2016; GONÇALVES-OLIVEIRA et al., 2017).

Com relação ao gênero *Hohenbergia*, não existem artigos relacionados com a genética populacional de espécies do gênero. Alguns artigos que envolvem inferências filogenéticas, citogenéticas e de amplificação cruzada retratam espécies pontuais do gênero *Hohenbergia*, mas nenhum trata exclusivamente do grupo (COTIAS-DE-OLIVEIRA et al., 2000; PALMA-SILVA et al., 2007; CEITA et al., 2008; GOETZE et al., 2013; HELLER et al., 2015). Alguns artigos tratam exclusivamente do gênero *Hohenbergia*, mas apenas focando na taxonomia e ecologia das espécies do gênero (SIQUEIRA-FILHO; LEME, 1998; LEME, 2010), indicando uma carência de estudos específicos do grupo usando marcadores de DNA e outras abordagens moleculares.

2.5 COMPLEXO DE ESPÉCIES

A definição de espécie é um ponto crítico dentro da biologia. Os biólogos concordam entre si que, para facilitar o estudo da biodiversidade, é necessário delimitar a unidade ou entidade biológica, mas diversos são os conceitos para a definição exata do que é uma espécie (MAYDEN, 1997; QUEIROZ, 2007; ALDHEBIANI, 2018; HAIDER, 2018). Dos mais diversos conceitos criados para determinar uma espécie, o conceito biológico de espécies é o mais aceito (BOBAY; OCHMAN, 2017).

O conceito biológico de espécies criado por Mayr (1963) define espécie com relação ao intercruzamento, em que espécie corresponde a um conjunto de populações naturais que intercruzam entre si e são isoladas reprodutivamente das demais. Ou seja, o compartilhamento e fluxo gênico ocorre entre indivíduos da mesma espécie conferindo características únicas para eles, e, com isso, distinção dos demais grupos ou espécies. Porém, como todos os demais conceitos, esse conceito é criticado por muitos outros teóricos (SOKAL; CROVELLO, 1970; DONOGHUE, 1985).

Por se tratar de um tema complexo e não existir uma unificação, os cientistas vêm utilizando o conceito de espécie de acordo com o seu ponto de vista ou área (OLÁH et al., 2018; ZACHOS, 2015, 2018). Grande parte dos cientistas classificam as espécies de acordo com as características morfológicas que elas apresentam, porém, com a evolução das ferramentas moleculares, foi possível ter acesso ao material genético e evidenciar que nem sempre a definição das espécies baseada na morfologia estava correta (CHOI, 2016; KARANTH, 2017).

Devido à dificuldade em se determinar uma espécie, inúmeros complexos específicos estão sendo formados (HELLER et al., 2015; BÜNEKER; SOARES; DE ASSIS, 2016; PINZÓN et al., 2016). Complexo específico é a definição para duas ou mais entidades biológicas ou “espécies” que apresentam algumas características morfológicas semelhantes e não é possível estabelecer uma identificação exata de qual indivíduo pertence a qual espécie (CARSTENS et al., 2013). E, conseqüentemente, diversos estudos vêm sendo realizados na tentativa de esclarecimento desses complexos específicos, como por exemplo nas espécies: *Olea europaea* (BESNARD et al., 2007), *Vellozia hirsuta* (BARBOSA et al., 2012) e *Kielmeyera coriácea* (CADDAH et al., 2013).

3 RESULTADOS

Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Biogeography*

3.1 POPULATION GENETICS ANALYSIS REVEALS ENVIRONMENTAL INFLUENCE ON DIVERSITY PATTERNS OF A SPECIFIC BROMELIAD COMPLEX

Jéssica Figueredo-Campos¹, Rodrigo César Gonçalves-Oliveira¹, Santelmo Vasconcelos², Ana Maria Benko-Iseppon¹

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

² Instituto Tecnológico Vale, Instituto Tecnológico Vale, Belém, Pará, Brazil.

Corresponding author:

Ana Maria Benko Iseppon. Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal; Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brazil. E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Abstract

Aim

To characterize the genetic diversity of *Hohenbergia* species of the ridleyi complex in order to identify the major evolutionary events that shaped the morphologically diversified taxa in their current distribution. The genetic structure was accessed with the aim of testing the cohesion of the species within the ridleyi complex, including *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* and *H. salzmanii*, addressing the hypothesis that each of them comprises a natural species.

Location

Brazilian Northeastern region, including the states of Bahia, Sergipe, Pernambuco and Rio Grande do Norte.

Methods

Nuclear and chloroplast microsatellite markers were applied on populations of the ridleyi complex and species commonly confused as belonging the group, for analyzing the genetic diversity, using MSA software, and genetic structure through AMOVA test, Bayesian clustering attached to a Markov Chain Monte Carlo and Median-Joining haplotype network.

Main conclusions

Our study suggests the first evidence of high gene flow between different *Hohenbergia* species, which indicates conceptual problems to define species status within the group. Such a high gene flow can be explained by the pollination efficiency within the group. The species *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* and *H. salzmanii* correspond to a single biological entity, despite high morphological differences. Morphological taxonomic treatments may be supported, with the definition of novel names, to avoid formal extinction due to synonymizing of different morphotypes. Each morphotype might be considered for conservation purposes.

Introduction

Major geographic events like the movement of land masses, rising of a mountain chain, change of a river course, and climate change are usually evoked as responsible for shaping the evolutionary events that drove actual geographic patterns of distribution of related species (Cox, Moore & Ladle, 2016). In South America much attention has been paid to the phylogeographic and evolutionary history of bromeliads from different genera in environments of different kinds, mainly focusing on population genetic analysis (e.g.: Barbará, Martinelli, Fay, Mayo, & Lexer, 2007; Barbará et al., 2009; Palma-Silva et al., 2009, 2011; Hmeljevski, Nazareno, Bueno, Reis, & Forzza, 2017; Gonçalves-Oliveira et al., 2017).

Population genetic studies allow the evaluation of genetic imprints and evolutionary events set on populations, making possible to access the species' evolutionary history (Loeschcke, Tomiuk, & Jain, 2013). Genetic structure uncovers evolutionary processes to which populations have been subjected, such as genetic drift, natural selection and gene flow (Heuertz et al., 2004; Lemes, Grattapaglia, Grogan, Proctor, & Gribel, 2007; Loeschcke et al., 2013).

The Bromeliaceae is recognized as an important Neotropical plant group to assess genetic and evolutionary processes, mainly due to their rapid evolution and adaptive radiation attached to their high morphological diversification, especially on the Bromelioideae subfamily (Givinish et al., 2011).

Although many studies have examined the genetic structure of bromeliads, little is known about the genus *Hohenbergia*, which is among the most unresolved groups regarding infrageneric and intraspecific taxonomic relationships (Baracho, 2005; Siqueira-Filho & Leme, 2006). This genus comprises about 49 species (Gouda & Butcher, cont. upd.), of which 48 occur exclusively in Brazil (Flora do Brasil, 2020). Specimens from this genus are commonly found in Northeastern Brazil biomes, with great diversity in the Atlantic Forest and Espinhaço Range of Bahia (Martinelli et al., 2008; Versieux, Wendt, Louzada, & Wanderley, 2008; Gonçalves-Oliveira & Wanderley, 2017).

Due to the difficulty in defining a species and not unifying the concept of species, many species complexes have been formed (Heller, Leme, Schulte, Benko-Iseppon & Zizka, 2015; Büneker; Soares; De Assis, 2016; Pinzón et al., 2016; Aldhebiani, 2018). The genus *Hohenbergia* because it has a wide morphological plasticity, has some complexes of species, such as the *ridleyi* complex. This complex is composed by three species (*H. ramageana*, *H. ridley* and *H. isepponae*) with few morphological differences, as inflorescence morphology, shape of the tank and size of floral bracts

(Siqueira-Filho & Leme, 2006; Gonçalves-Oliveira & Wanderley, 2017). Two other species may be considered as belonging to the complex: *H. salzmanii* and *H. edmundoi* (R. C. Gonçalves-Oliveira, pers. comm.).

The *ridleyi* complex species has a longitudinal distribution in the Atlantic Forest, occurring from Rio Grande do Norte to São Paulo state (approximately 2.833 km), presenting two large biodiversity centers with higher population density, one within the states of Pernambuco, Paraíba, and Alagoas and another in the South of Bahia (Flora do Brasil, 2020). The Atlantic Forest history was marked by strong climatic oscillations during the Pleistocene which caused constant expansions and contractions, as of the Atlantic Forest as of the Cerrado. These oscillations caused a big vegetational change in a way that affected the continuity and extension of these biomes (Pennington et al., 2004; Antonelli, Nylander, Persson, & Sanmartín, 2009; Hoorn et al., 2010; Antonelli & Sanmartín, 2011).

The “Brejos de altitude” of the state of Pernambuco, for example, are recognized as northeastern marshes or mountain forests, are humid forests surrounded by caatinga vegetation (Câmara, 2003; Andrade-Lima, 2007). Populations of *H. ramageana* and *H. ridleyi* co-occur both in “Brejos de altitude” and at the coastal Atlantic Forest (Siqueira-Filho & Leme, 2006). Therefore, evaluating the genetic structure of *Hohenbergia* populations may allow a better understanding of taxonomy, pattern of species distribution and of microevolutionary processes that shape populations, assisting in management and conservation actions (Avice, 2000).

Several molecular tools have been applied to characterize the diversity of population genetic structure, as well as the resolution of taxonomic uncertainties in regard to species relationship and specific complexes (e.g. *Olea europaea*, Besnard et al., 2007; *Vellozia hirsuta*, Barbosa, Fiorini, Silva-Pereira, Mello-Silva, & Borba, 2012; *Kielmeyera coriacea*, Caddah et al., 2013). Microsatellite is the most used molecular marker to evaluate the genetic diversity and population structure, which comprise tandem repeat sequences of DNA. In eukaryotes, these sequences are present in the nucleus, in chloroplast (in plants) and in mitochondria (Ellegren, 2004; Agarwal, Shrivastava, & Padh, 2008). Nuclear microsatellite markers (nuSSR) are codominant, have Mendelian inheritance and a high polymorphic degree, being applicable population genetic analysis and to compare closely related species (Nybohm, Weising, & Rotter, 2014). The chloroplast microsatellite markers (cpSSR) are haploid, have uniparental inheritance and usually maternal inheritance in angiosperms, being also applicable to the evaluation of the variability within and between populations (Taberlet, Gielly, Pautou, & Bouvet, 1991; Olmstead & Palmer, 1994).

The most commonly used procedure to access these SSR markers regards their heterologous amplification. This procedure uses markers developed for related species, assessed for their transferability to the target species, reducing costs for the

development of species-specific SSRs (Zucchi et al., 2004; Lavor, van den Berg, & Versieux, 2013; Gonçalves et al., 2016; Zanella, Palma-Silva, Goetze, & Bered, 2016) a strategy also used in the present work.

On this paper, we aim to (i) characterize the genetic diversity of *Hohenbergia* species that belongs to the *ridleyi* complex, (ii) identify possible effects from major evolutionary events that shaped members of this complex by accessing the genetic structure, (iii) test the species cohesion within the *ridleyi* complex by analyzing the genetic differences between the specimens identified as *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* and *H. salzmanii*. Our hypothesis is that these species comprise a single species entity.

Material and Methods

Population sampling

A total of 181 individuals from natural populations of *ridleyi* complex [*H. ramageana* and *H. ridleyi*, using the sinonimization of Baracho(2005)], *H. edmundoi* and *H. salzmanii* were collected along the distribution of the species in the states of Bahia (BA), Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) and Sergipe (SE) (Figure 1; Table 1). The distance between the North population (Jundiaí, RN) to the South population (Ubatã, BA) comprises approximately 1.322 km (Figure 1). *H. isepponae* was not collected because it was not found in the field. *H. edmundoi* and *H. salzmanii* which present some morphological similarities and are commonly confused as *H. ramageana* were included in the analysis for an investigation of their genetic relationship. In the field, the populations were collected according the presence in the place trying cover the maximum of individuals present. The search was realized according to the previous collect registered found in species link website. Fresh leaves were packed into plastic tubes containing 98% of supersaturated cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) solution to avoid the oxidative process in DNA (Rogstad, 1992).

Table 1- Collections of populations of the ridleyi complex in Brazilian Northeast. All populations were collected in the field in northeastern Brazilian region.

State	Putative species	Initials	Location	Environment	N	Latitude	Longitude
BA	<i>H. salzmanii</i>	ITA	Itagibá	Moist Forest	8	-14.17	-39.74
	<i>H. salzmanii</i>	MAR	Maraú	Moist Forest	5	-13.91	-38.95
	<i>H. salzmanii</i>	UBA	Ubatã	Moist Forest	9	-14.18	-39.74
PE	<i>H. ridleyi</i>	JAL	João Alfredo	Dry Atlantic Forest	21	-7.835	-35.59
	<i>H. ridleyi</i>	SDA	Lagoa dos Gatos	Dry Atlantic Forest	6	-7.89	-35.17
	<i>H. ridleyi</i>	TAQ	Taquaritinga do Norte	Dry Atlantic Forest	12	-7.908	-36.03
	<i>H. ridleyi</i>	EXE	Paudalho	Dry Atlantic Forest	14	-7.832	-35
	<i>H. ridleyi</i>	GOI	Goiana	coastal	13	-7.64	-34.96
	<i>H. ridleyi</i>	JSA	Jaboatão dos Guararapes	Moist Forest	13	-8.133	-35.03
	<i>H. ridleyi</i>	LGA	Lagoa dos Gatos	Dry Atlantic Forest	8	-8.694	-35.86
	<i>H. ridleyi</i>	UFP	Recife	Dry Atlantic Forest	5	-8.052	-34.95
	<i>H. ridleyi</i>	UFR	Recife	Dry Atlantic Forest	7	-8.014	-34.95
	RN	<i>H. cf. edmundoi</i>	ALC	Alcaçus	Coastal Area	19	-6.007
<i>H. cf. edmundoi</i>		MBJ	Jundiaí	Ecotone Area	17	-5.892	-35.37
SE	<i>H. cf. edmundoi</i>	PIR	Pirambu	Coastal Area	10	-10.67	-36.67
	<i>H. cf. edmundoi</i>	ARB	Areia Branca	Coastal Area	13	-10.77	-37.34
Total		16			181		

Abbreviations: BA= Bahia; PE= Pernambuco; RN= Rio Grande do Norte; SE= Sergipe; N= Number of individuals.

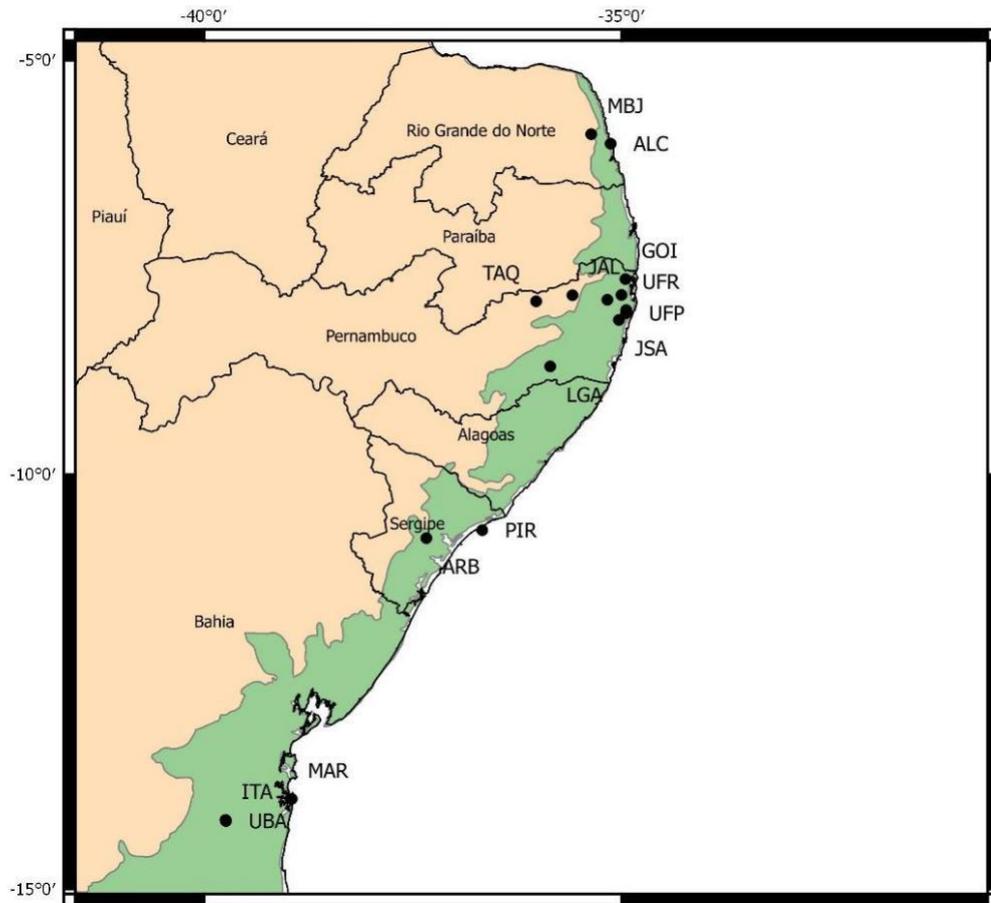


Figure 1- Geographic distribution of sampled populations of *ridleyi* complex in northeastern Brazil (see Table 1 for abbreviations).

DNA extraction

DNA extraction was performed according to the CTAB protocol described by Weising, Nybom, Pfenninger, Wolff, & Kahl (2005). All samples were subjected to selective polysaccharide precipitation as described by Michaels, John, & Amasino (1994) and RNase treatment. Subsequently, all samples were quantified in the NanoDrop spectrophotometer and diluted to 5 ng/ μ L.

Microsatellite amplification

Nuclear (nuSSR) and chloroplast (cpSSR) microsatellite markers available for related species (Weising & Gardner, 1999; Wöhrmann & Weising, 2011; Krapp et al., 2012; Goetze et al., 2013; Aoki-Gonçalves, Louzada, De Souza, & Palma-Silva, 2014)

were tested in a pilot sample with eight individuals from different populations (see Appendix S1 in Supporting Information).

Polymorphic markers (see Appendix S2) were applied to populations by PCR. The reactions were conducted in TECHNE® thermocycler with specific reagents concentrations and programs according to the description by the original article for each primer pair (Weising & Gardner, 1999; Wöhrmann & Weising, 2011; Krapp et al., 2012; Goetze et al., 2013; Aoki-Gonçalves et al., 2014).

Products generated by nuclear markers from ACOM primers were visualized by electrophoresis performed on 6% acrylamide gel stained with silver nitrate. The remaining markers were genotyped on ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) by applying *primers* with M13 tail, which allowed the fluorescence staining (VIC, FAM, and NED) and subsequent multiplexed genotyping. Molecular sizes in base pairs were determined using the GENESCAN-600 LIZ size standard (Applied Biosystems). Resulting files from the sequencers were analyzed using SOFT GENETICS GENEMARKER Demo software (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Parameters of the genetic diversity, such as the number of alleles by population, allele richness (A_{rs}), expected (H_e) and observed heterozygosity (H_o), polymorphism information content (PIC) and inbreeding coefficient (F_{is}) were performed using the MSA software (Dieringer & Schlötterer, 2003). Estimation of the presence of null alleles was performed using the Micro-Checker version 2.2.0.3 (Van Oosterhout, Cock, et al., 2004). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were evaluated using exact tests were performed using GENEPOP on the Web (Raymond & Rousset, 1995). Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was performed using the ARLEQUIN 3.5 software (Excoffier, Laval, & Schneider, 2005) and F-statistics values [Differentiation among populations (F_{st}); Differentiation among populations within groups (F_{sc}); Differentiation within populations (F_{ct})] were calculated from the AMOVA (Excoffier, Smouse, & Quattro, 1992). A hierarchical AMOVA was used to calculate the F_{st} values between different arrangements of the groups, comparing location and species regions of *ridleyi* complex. The groups previously settled were 1 - Coast of Pernambuco (EXE, GOI, JSA, LGA, UFP, UFR); 2 - Montane Forest of Pernambuco (JAL, TAQ, SDA); 3 - Sergipe Restingas (ARB, PIR); 4 - Rio Grande do Norte (ALC, MBJ); 5 - Bahia Atlantic Forest (ITA, MAR, UBA). To compare whether the genetic distance matrix correlates with the geographic distance matrix a Mantel test was performed on ARLEQUIN 3.5 software (Mantel, 1967; Excoffier et al., 2005). To evaluate the significance of Mantel test a linear regression on the R software (R Core Team, 2017) was performed.

Genetic structuring among the 16 populations was assessed using the Bayesian clustering analysis attached to a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach implemented in STRUCTURE (version 2.3.4; Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000), assuming an admixture model. For the determination of the most appropriate number of genetic clusters (K -value), the analysis was run for 500,000 generations after a burn-in period of 10,000 generations. Ten repetitions for each K ($1 \leq K \leq 20$) were performed, and the admixture level for each individual (Q) was also inferred. The best number of genetic clusters was chosen by calculating the K statistic of Evanno, Regnaut, & Goudet (2005), using STRUCTURE HARVESTER (version 0.6.94; Earl & von Holdt, 2012).

The analyses for the cpSSRs were performed on the HAPLOTYPE software (version 1.05; Eliades & Eliades, 2009), with estimation of genetic diversity (D_v), haplotype richness (H_{rs}) and the number of private alleles (Prv). A Median-Joining haplotype network was inferred on NETWORK version 5.0.0.3 (Fluxus TechnologiesTM).

Results

Among the 35 markers tested, only 10 were efficient for ridley's population studies, which comprised to seven nuSSR and three cpSSR. 69 polymorphic alleles were generated by nuSSR markers, with eight to 30 alleles per *locus*, whereas 33 alleles regarded cpSSR, with four to 21 alleles per *locus* (see Appendix S2). The characterization of nuSSR *loci* in populations of the ridleyi complex are presented in Appendix S3. The expected heterozygosity ranged from 0.221 (Acom12.12) to 0.839 (Ac25), and the observed heterozygosity ranged from 0.054 (Ac40) to 0.537 (Ac25). The highest PIC value was 0.75 for the *locus* Ac55, and the lowest was 0.179 for the *locus* Acom12.12. Almost all *loci* showed high F_{is} values (0.3319 - 0.8822) except for Acom64.22 that presented a very low value (-0.113). The same pattern of locus with high values was observed for the F_{it} . High F_{st} values were observed for the loci Ac40, Ac55, and Acom12.12. According to the analyzes of the Micro Checker, three (Acom71.3, Ac55, Ac40) of seven nuclear *loci* may have presence of null alleles.

The genetic diversity parameters obtained for nuSSRs in each population are listed in Table 2. The average number of alleles per population was 26 and ranged from 11 (MAR) to 39 (GOI). The allelic richness (AR) ranged from 1.860 (PIR) to 2.724 (UBA). The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.169 (LGA) to 0.4591 (ARB), and the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.292 (PIR) to 0.703 (JSA). The inbreeding coefficient (F_{is}) was moderate to high in the populations and ranged from

0.214 (PIR) to 0.603 (LGA). Almost all populations are in Hardy-Weinberg equilibrium, except PIR that present P-value of 0.0809.

Table 2- Genetic diversity parameters using seven *loci* of nuSSR and three *loci* of cpSSR per populations of *ridleyi* complex.

Pop	nuSSRs							cpSSRs				
	N	A	AR	H _o	H _e	F _{is}	HWE	N	A	Nb	Prv	Hrs
ITA	8	26	2.663	0.353	0.596	0.330	0.0000*	8	6	4	2	1.875
MAR	5	11	1.979	0.18	0.350	0.433	0.0105*	5	4	2	0	1
UBA	9	27	2.724	0.335	0.641	0.472	0.0004*	8	8	4	3	1.875
JAL	21	36	2.242	0.393	0.555	0.245	0.0000*	21	5	4	2	0.714
SDA	6	24	2.411	0.393	0.614	0.262	0.0001*	6	3	2	2	1.755
TAQ	12	29	2.462	0.345	0.668	0.474	0.0000*	12	5	4	0	1
EXE	14	24	2.271	0.281	0.505	0.383	0.0000*	15	5	5	3	1.333
GOI	13	39	2.476	0.432	0.633	0.250	0.0001*	13	3	2	0	0.641
JSA	13	32	2.662	0.344	0.703	0.470	0.0000*	13	2	1	0	0
LGA	8	15	2.220	0.169	0.457	0.603	0.0000*	8	6	4	3	1.875
UFP	5	23	2.654	0.393	0.659	0.329	0.0019*	5	6	5	3	4
UFR	7	24	2.367	0.282	0.495	0.350	0.0000*	7	6	4	2	2.143
ALC	19	29	2.467	0.219	0.535	0.595	0.0000*	17	8	6	4	1.47
MBJ	17	25	2.163	0.231	0.493	0.409	0.0000*	17	7	5	5	1.397
ARB	13	34	2.658	0.459	0.657	0.229	0.0000*	10	10	8	5	3.417
PIR	10	18	1.860	0.229	0.292	0.214	0.0809	10	5	3	3	1
Mean		26	2.392	0.432	0.633	0.378			5.563	3.938	2.313	1.593

*P<0.05. Abbreviations: N= sample size in each population; A= number of alleles detected in each population; AR= allele richness; H_o= observed heterozygosity; H_e= expected heterozygosity; F_{is}= inbreeding coefficient; HWE= Hardy-Weinberg equilibrium. Nb= number of haplotypes; Prv= number of private haplotypes; Hrs= haplotypic richness.

The genetic diversity parameters of the cpSSRs are presented in Table 2. All *loci* were polymorphic with 11 (N10), 22 (N15) and four alleles (N16). The number of alleles per population ranged from two (JSA) to 10 (ARB), with a mean of 5.563 alleles per population. The combination of alleles resulted in 45 haplotypes, of which 34 were present in a single population, being considered private haplotypes (see Appendix S4). The haplotype 15 (102 94 94) was the most frequent, present in 61 of the 175 individuals analyzed. The total number of private alleles per population ranged from two to five, with four populations without private alleles (MAR, SDA, GOI, and JSA) (see Appendix S5). The haplotypic richness ranged from zero (JSA) to four (UFP) with a mean of 1.593 per population (Table 2).

The haplotypes split the populations according to their environment (Atlantic Forest, restinga, and ecotone), except for the populations of Pernambuco and PIR (Figure 2). Populations of Pernambuco presented a pattern of haplotype presence (15 and 19) that isolated populations of this state from the others, whereas PIR presented only private haplotypes (Haplotypes- 7, 44 and 45 with high frequency). Two mutations

were registered in the network isolating two groups with nine (H2, H3, H26, H27, H28, H29, H30, H31, H44) and five haplotypes (H4, H5, H8, H36, H37). Almost all these haplotypes were present in populations that do not belong to Pernambuco state. The populations of this group with a higher number of haplotypes were MBJ (3), UBA (3), ARB (2) and ALC (2).

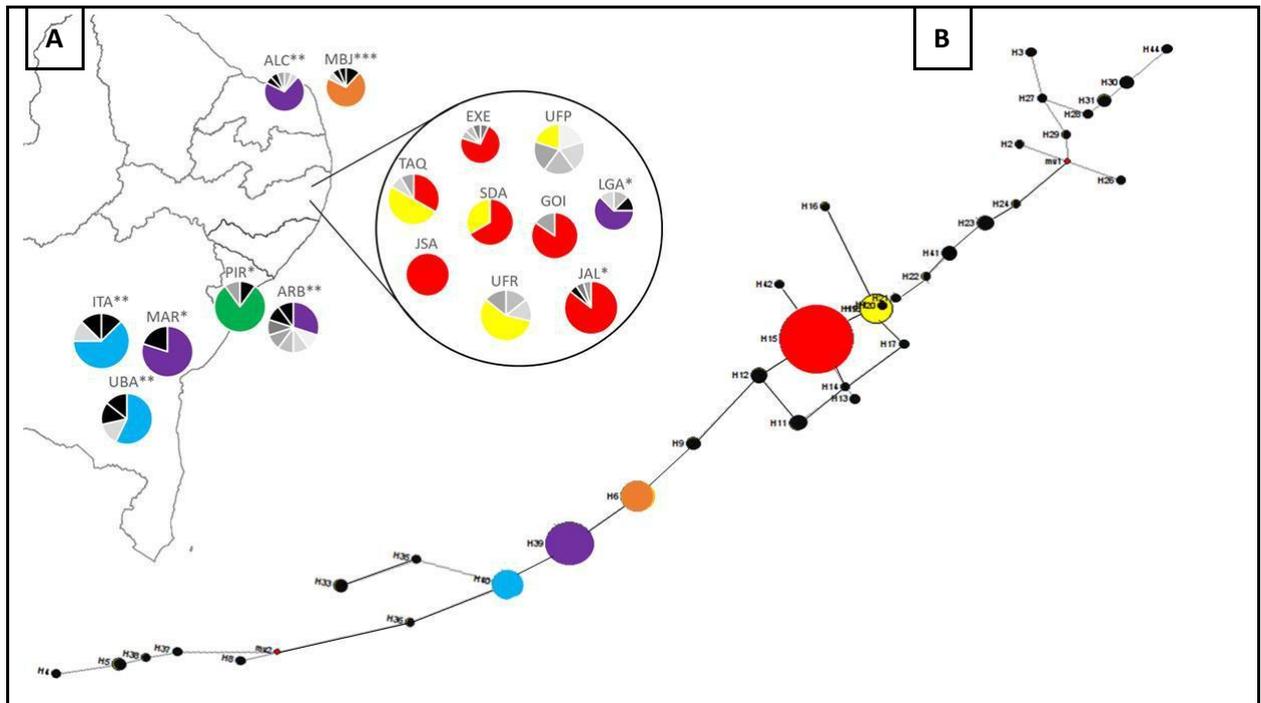


Figure 2- A. Occurrence of more frequent haplotypes in each population of ridleyi complex. * and black color were used to indicate each mutated haplotype. **B.** Median-joining network of cpSSRs haplotypes. The circles indicate the haplotypes and the size of each circle is proportional to the observed frequency of each type. Small red circles specified with mu1 and mu2 indicate the occurrence of mutations.

The AMOVA results for nuSSRs and cpSSRs are in Table 3. The differentiation among populations (F_{st}) was of 0.1518 for the nuSSR and of 0.6499 for the cpSSR. The highest percentage of variation (84.82%) was obtained within populations for the data set nuSSR.

Table 3- Analysis of molecular variance (AMOVA) for seven nuclear and three chloroplast SSR markers in populations of the *ridleyi* complex.

Source of variation	nuSSRs			cpSSRs		
	d.f.	Percentage of variation	F-Statistics	d.f.	Percentage of variation	F-Statistics
Among populations	4	3.29	$F_{st}=0.1518^*$	4	26.76	$F_{st}=0.6499^*$
Among populations within groups	11	11.89	$F_{sc}=0.1229^*$	11	38.23	$F_{sc}=0.5220^*$
Within populations	344	84.82	$F_{ct}=0.0329$	159	35.01	$F_{ct}=0.2676$
Total	359			174		

Notes: F_{st} = differentiation among populations; F_{sc} = differentiation among populations within groups; F_{ct} = differentiation within populations; *significant values with $P \leq 0.0001$.

The F_{st} values comparing location regions of the *ridleyi* complex are shown in Table 4. The highest value was obtained for the comparison between Rio Grande do Norte (*H. cf. edmundoi* - ALC, MBJ) and Bahia (*H. salzmanii* - ITA, MAR, UBA) with the F_{st} of 0.2461. The lowest F_{st} value was obtained in the comparison between montane forest (“Brejos de altitude”) and the coast of Pernambuco, both regarding *H. ridleyi* species ($F_{st} = 0.0440$).

Table 4- F_{st} values comparing location regions of the ridleyi complex.

Regions	F_{st}
Hierarchical	0.1471
With regions	0.1518
Inter-states	0.1624
Coast of PE x Montane Forest of PE	0.0440
Coast of PE x SE Restingas	0.1295
Coast of PE x RN	0.1601
Coast of PE x BA Atlantic Forest	0.1054
Montane Forest of PE x SE Restingas	0.162
Montane Forest of PE x RN	0.2127
Montane Forest of PE x BA Atlantic Forest	0.1474
SE Restingas x RN	0.2392
SE Restingas x RN x BA Atlantic Forest	0.2349
SE Restingas x BA Atlantic Forest	0.1936
RN x BA Atlantic Forest	0.2461
Coast and Montane Forest of PE x SE Restingas	0.1563
Coast and Montane Forest of PE x RN	0.1860
Coast and Montane Forest of PE x BA Atlantic Forest	0.1563

Notes: Coast of Pernambuco (EXE, GOI, JSA, LGA, UFP, UFR); Montane Forest of Pernambuco (JAL, TAQ, SDA); Sergipe Restingas (ARB, PIR); Rio Grande do Norte (ALC, MBJ); Bahia Atlantic Forest (ITA, MAR, UBA); See table 1 for abbreviations. All P -values ≤ 0.001 .

The structuring of the populations revealed the presence of four clusters ($K = 4$) among the populations of the ridleyi complex (Figure 3). The clusters are divided as follow (Figure 4):

- Cluster 1 = JAL, UFR, TAQ, UFP, EXE, SDA, LGA that includes populations from the Dry Atlantic Forest in the North Portion of Pernambuco;
- Cluster 2 = MAR, JSA, ITA, UBA that includes the moist forest of Bahia and the moist forest of southern Pernambuco;
- Cluster 3 = GOI, ALC, PIR, ARB that includes the coastal populations from RN and SE;
- Cluster 4 = MBJ that includes an ecotone population in RN.

The proportion of each population of ridleyi complex in each of the four clusters ranged from 0.404 to 0.956 (Table 5). Two populations (UFR and ARB) presented little variation in the proportion of membership between two different clusters. These

differences were 0,033 between the cluster 1 and 3 and 0.11 between the cluster 2 and 3, respectively. F_{st} values between clusters were lower than 0.2, except for cluster 4, that harbor MBJ population (Table 6). These clusters formed and the high interaction between the populations reveal that the species *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* and *H. salzmanii* correspond to a single biological entity.

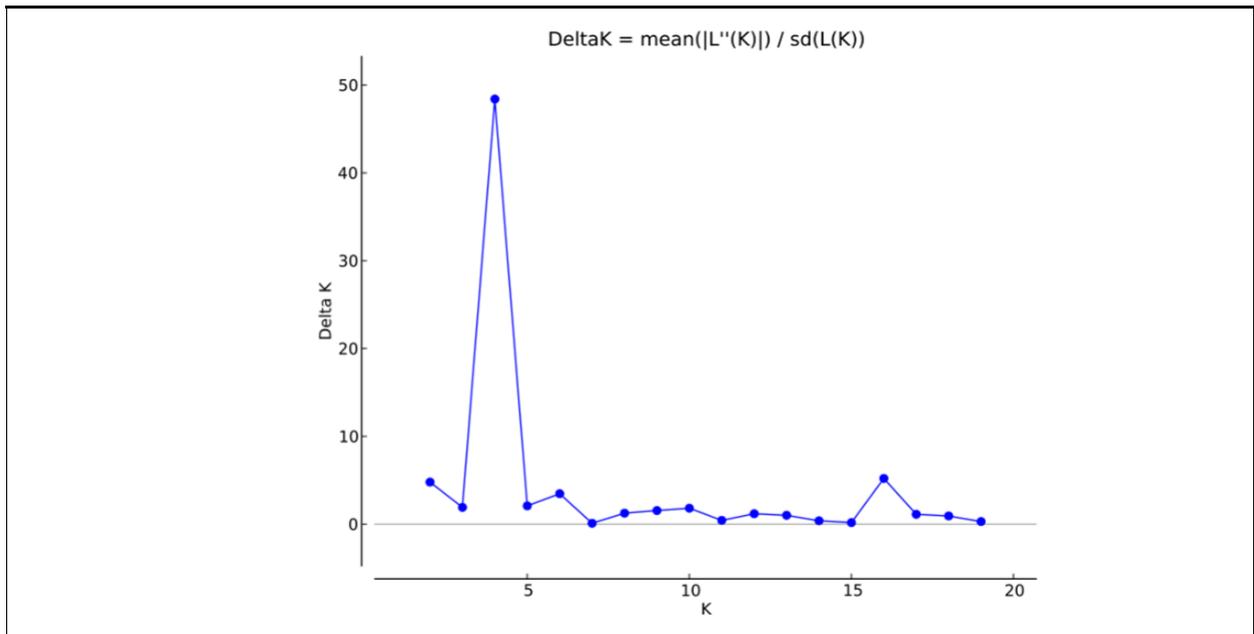


Figure 3- Magnitude of K from structure analysis by Evanno et al. (2005), for ridleyi complex microsatellite data.

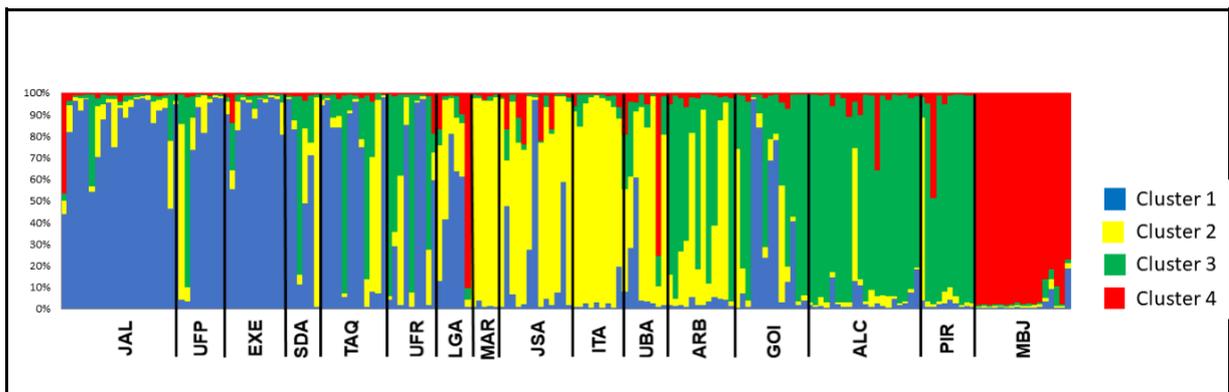


Figure 4- Bar plot of four clusters ($K = 4$) according to the STRUCTURE analysis based on seven nuSSR markers. The populations of the ridleyi complex are delimited from each other by vertical black lines. See Table 1 for abbreviations.

Table 5- Proportion of membership of each population of the ridleyi complex in each of the 4 clusters. The higher proportions are highlighted in bold.

Pop	Dry forest	Humid forest	Restinga	Ecotone
ITA	0.015	0.929	0.041	0.015
MAR	0.015	0.956	0.014	0.014
UBA	0.143	0.595	0.132	0.131
JAL	0.844	0.072	0.048	0.035
TAQ	0.617	0.156	0.213	0.014
SDA	0.521	0.245	0.218	0.016
EXE	0.907	0.04	0.034	0.019
GOI	0.326	0.083	0.572	0.019
JSA	0.198	0.689	0.036	0.077
LGA	0.404	0.283	0.137	0.176
UFP	0.512	0.25	0.225	0.012
UFR	0.448	0.129	0.415	0.008
ALC	0.046	0.057	0.853	0.045
MBJ	0.024	0.011	0.02	0.945
ARB	0.026	0.421	0.531	0.022
PIR	0.02	0.109	0.805	0.067

Note: see table 1 for abbreviations.

Table 6- F_{st} values of four clusters formed by analysis in STRUCTURE software based on nuSSRs applied on populations of ridleyi complex.

F_{st} of clusters	
Cluster 1	0.1473
Cluster 2	0.0617
Cluster 3	0.0963
Cluster 4	0.317

The Mantel test indicated no correlation between the geographic distance and genetic divergence for results of nuSSR $r = 0.29$, $p < 0.06$ (Figure 5A) and low correlation for cpSSR data $r = 0.31$, $p < 0,004$ (Figure 5B).

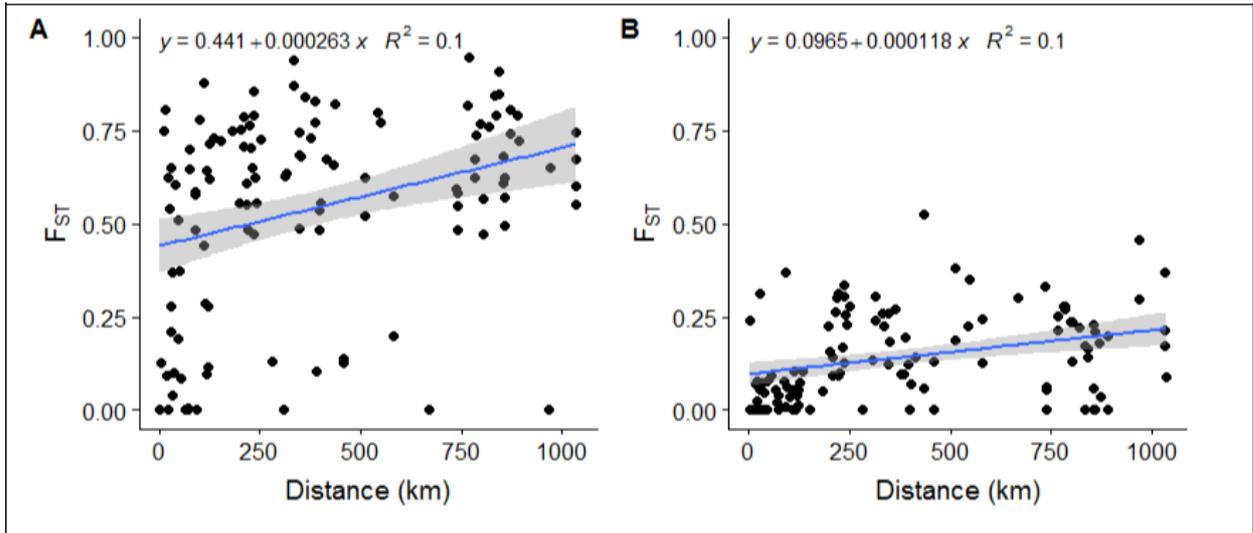


Figure 5- Relationship between genetic divergence (based on F_{st}) and geographical distances in kilometers among populations of the ridleyi complex. **A.** Analysis with nuSSR data; **B.** Analysis with cpSSR data. For both analyzes $p < 0,001$.

Discussion

Genetic diversity

Our results show that surprisingly the ridleyi complex is composed by only one biologic entity instead of four. Likewise, despite a high gene flow among the populations, the genetic diversity is low indicating that the conservation of the species is urgently needed. Therefore, our results show that genetic studies can be used both for better identifying species and to conservation and restoration purposes.

In general, the populations show low to moderate genetic diversity, which similar results can be found in different genetic studies of the family (Lavor, van den Berg, Jacobi, Carmo, & Versieux, 2014; Soares et al., 2018), show a high number of alleles, high F_{is} values and low H_o values in comparison to the H_e ones. Even with these results almost all populations are in equilibrium of Hardy-Weinberg (except for PIR).

Such low diversity is not expected mostly because *H. ridleyi* species present self-incompatible reproductive system (Siqueira-Filho & Machado, 1998). The results indicate self-compatibility characteristics, however the higher F_{st} value obtained from the plastid data than in nuclear data, indicates that seed migration is much less common than pollen dispersal which reveals a great gene exchange between the individuals (McCauley, 1994). The reproductive strategy of the ridleyi complex is highly

unknown, since there is only one study which has examined the reproductive system of one species of the complex (Siqueira-Filho & Machado, 1998). In order to understand better why these self-compatibility characteristics are present in the complex is necessary to realize future studies of the reproductive system.

Previous studies with *Bromelia antiacantha* Bertol populations (Bromelioideae), uncovered the same mating system as *H. ridleyi* beside a high inbreeding coefficient ($F_{is} = 0.431$ and $F_{it} = 0.542$). Therefore, in contrast to the present study, they found high F_{st} values (0.224). This result was probably influenced by the presence of polyploidy in the group (Zanella et al., 2011).

Such characteristics are uncommon on bromeliads, and as discussed for *B. antiacantha*, these patterns can be the result of Wahlund effect and/ or null alleles (Zanella et al., 2011; Waples, 2015). According to the results obtained from MicroChecker analysis, may have null alleles in the sampling which could be interfering the real value of homozygosity, but excluding the *loci* that may have null alleles we still have high values of F_{is} and expected heterozygosity higher than observed heterozygosity. Besides that, null-alleles may not interfere on the Hardy-Weinberg equilibrium of the populations, since they are a common feature in such markers.

Genetic structure

The Mantel test indicates a low correlation between the geographic and genetic distances matrices, suggesting low isolation by distance among *ridleyi* complex populations. Therefore, the STRUCTURE results with $K=4$, for both nuclear and chloroplast data, indicates that the populations are structured according to their environment.

Based on nuSSRs data, the structuring performed on STRUCTURE split the populations into four groups: dry forest, humid forest, coastal area and ecotone area between Atlantic Forest and Caatinga. Population JSA, an outlier of Pernambuco, that groups with populations from Bahia state, belongs to a most humid forest in Southern Pernambuco according to definitions from Andrade-Lima (2007). The clusters show a moderate structuring according to putative species/populations. However, the F_{st} value is low (0.1518) indicating limited differentiation between populations and high gene flow, considering significant differentiation between populations with F_{st} values higher than 0.25 (Slatkin, 1987). These results have been also reported for *Vriesea cacuminis*, which presented low F_{st} (0,16) and population structuring according to the location of the region, probably due to crossbreeding between species (Ribeiro et al., 2013).

The haplotype network generated by the cpSSRs data confirms the presence of a closely central cluster with populations of Pernambuco. The Pernambuco's cluster presents private haplotypes (Haplotypes 15 and 19), whereas the major number of mutated haplotypes occur in populations out of Pernambuco. In other words, it is possible that the Pernambuco region comprises more ancient populations of the complex in comparison with the other analyzed locations.

PIR population presented only private haplotypes in all individuals differing from all other sampled localities (Haplotypes- 7, 44 and 45 with high frequency). According to the results obtained for nuSSRs, the other populations can be distinguished by the environment where they are present (Atlantic Forest, restinga, and ecotone).

Taxonomic and evolutionary implications

According to the biological species concept (Mayr, 1976), a species comprises groups of beings that potentially reproduce with each other and share a common genome and are isolated from other groups. Many species have been described among the *Hohenbergia* on the past decades (Barbará et al., 2007, 2009; Boisselier-Dubayle, Leblois, Samadi, Lambourdière, & Sarthou., 2010; Palma-Silva et al., 2011), all of them based solely on morphological traits. To identify a species within Bromeliaceae has been a challenge, especially within the *Hohenbergia* genus and species complexes, mostly due to the lack of good taxonomic reviews or scarce description of species (Gonçalves-Oliveira & Wanderley, 2017).

Our results bring the first molecular evidence of high gene flow between *Hohenbergia* described species, what can lead to future conceptual problems to define a new species within this group. In the inselbergs of Rio de Janeiro species of *Pitcairnia* showed introgression and interspecific gene flow on nuclear markers. Moreover, different species showed more similarities to chloroplast haplotypes due to closeness than individuals from the same species located in other inselbergs (Palma-Silva et al., 2011). Our results highlight that populations of the ridleyi complex have a significant gene flow due to pollination efficiency. It is important to remark that the *Hohenbergia* flowers are all purple and have the same shape (Smith, 1989). Thus, the species *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* and *H. salzmanii* correspond to a single biological entity, with morphological particularities. Therefore, morphological taxonomic treatments may be supported, with the definition of novel names, to avoid formal extinction due to synonymizing of different morphotypes. Thus, each morphotype might be considered for conservation.

APPENDICES

Appendix S1

Table S1.1- Nuclear and chloroplast SSR markers transferred from related species to selected individuals of the *ridleyi* complex.

Type	Species	Loci	N
Nuclear	<i>Aechmea caudata</i> Lindm	Ac01, Ac11, Ac12, Ac25, Ac35, Ac40, Ac55, Ac64, Ac78, Ac88	10
	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr	Acom12.12, Acom22.22, Acom64.22, Acom71.3, Acom91.2	5
Chloroplast	<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> L. B. Sm.	L1, L4, L6, N5, N7, N10, N15, N16, N18	9
	<i>Nicotiana tabacum</i> L. (Universal primers)	ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp7	6
	<i>Orthophytum ofiuroides</i> Louzada & Wand	Op17, Op28, Op30, Op69, Op93	5
Total			35

Abbreviation: N= number of *loci*.

Appendix S2

Table S2.2- Number of alleles per population obtained for the polymorphic *loci* using primers of *Aechmea caudata*, *Ananas comosus* and *Dyckia marnier-lapostollei* in populations of the ridleyi complex.

Type	Loci	Number of alleles
Nuclear	Ac11	21
	Ac25	28
	Ac40	15
	Ac55	30
	Acom12.12	8
	Acom64.22	9
	Acom71.3	20
Chloroplast	N10	11
	N15	21
	N16	4

Appendix S3

Table S3.3- Characterization of seven nuSSRs in populations of ridleyi complex.

<i>Loci</i>	A	H_e	H_o	PIC	F_{is}	F_{it}	F_{st}	HWE
Ac11	21	0.725	0.366	0.597	0.4428	0.4980	0.0990*	0.0000*
Ac25	28	0.839	0.537	0.750	0.3401	0.3966	0.0856*	0.0000*
Ac40	15	0.474	0.054	0.372	0.8822	0.9067	0.2087*	0.0000*
Ac55	30	0.710	0.379	0.625	0.4046	0.5246	0.2016*	0.0000*
Acom12.12	8	0.221	0.163	0.179	0.3589	0.6143	0.3983*	0.0000*
Acom64.22	9	0.260	0.283	0.216	-0.113	-0.028	0.0765*	0.4238
Acom71.3	20	0.676	0.454	0.585	0.3319	0.4298	0.1465*	0.0000*
Over all <i>loci</i>	69	0.558	0.319	0.475	0.4282	0.5212	0.1626*	

Abbreviations: F_{is}= inbreeding coefficient; F_{it} = overall inbreeding coefficient; F_{st} = fixation index; HWE= Hardy-Weinberg equilibrium. **P*-value<0.0001.

Appendix S4

Table S4.4- Haplotypes obtained for three cpSSR *loci* (N10, N15 and N16) for the populations of the *ridleyi* complex.

Haplotype Code	Haplotype	Counts
haplo-1	101 95 94	1
haplo-2	102 118 94	1
haplo-3	102 125 94	1
haplo-4	102 50 161	1
haplo-5	102 78 154	2
haplo-6	102 78 94	12
haplo-7	102 78 95	1
haplo-8	102 82 124	1
haplo-9	102 90 94	1
haplo-10	102 91 94	1
haplo-11	102 93 93	3
haplo-12	102 93 94	3
haplo-13	102 94 67	1
haplo-14	102 94 93	1
haplo-15	102 94 94	61
haplo-16	102 95 111	1
haplo-17	102 95 93	1
haplo-18	102 95 94	1
haplo-19	102 95 95	13
haplo-20	102 96 95	1
haplo-21	102 97 95	1
haplo-22	102 98 94	1
haplo-23	103 104 94	1
haplo-24	103 109 94	1
haplo-25	103 110 94	1
haplo-26	103 118 95	1
haplo-27	103 125 94	1
haplo-28	103 125 95	1
haplo-29	103 132 94	1
haplo-30	103 132 95	2
haplo-31	103 138 94	2
haplo-32	103 158 94	1
haplo-33	103 49 94	1
haplo-34	103 49 95	1
haplo-35	103 69 95	1
haplo-36	103 78 116	1
haplo-37	103 78 147	1
haplo-38	103 78 154	1
haplo-39	103 78 94	24
haplo-40	103 78 95	11
haplo-41	103 78 98	1
haplo-42	103 94 94	1
haplo-43	103 98 94	1
haplo-44	104 138 95	1
haplo-45	104 78 95	8
Total	45	175

Appendix S5

Table S5.5- List of private haplotypes and frequencies by population of the ridleyi complex.

Haplotype Code	Haplotype	Population	Frequencies
haplo-1	101 95 94	UFPE	1
haplo-2	102 118 94	MBJ	1
haplo-3	102 125 94	MBJ	1
haplo-4	102 50 161	UBA	1
haplo-7	102 78 95	PIR	1
haplo-8	102 82 124	JAL	1
haplo-9	102 90 94	JAL	1
haplo-10	102 91 94	EXE	1
haplo-13	102 94 67	TAQ	1
haplo-14	102 94 93	EXE	1
haplo-16	102 95 111	UFPE	1
haplo-17	102 95 93	UFPE	1
haplo-18	102 95 94	EXE	1
haplo-20	102 96 95	UFR	1
haplo-21	102 97 95	UFR	1
haplo-22	102 98 94	MBJ	1
haplo-23	103 104 94	ALC	1
haplo-24	103 109 94	ALC	1
haplo-25	103 110 94	ARB	1
haplo-26	103 118 95	UBA	1
haplo-27	103 125 94	ALC	1
haplo-28	103 125 95	UBA	1
haplo-29	103 132 94	LGA	1
haplo-31	103 138 94	ALC	1
haplo-32	103 158 94	LGA	1
haplo-33	103 49 94	LGA	1
haplo-34	103 49 95	ITA	1
haplo-35	103 69 95	ARB	1
haplo-36	103 78 116	ARB	1
haplo-37	103 78 147	ITA	1
haplo-38	103 78 154	ARB	1
haplo-41	103 78 98	ARB	1
haplo-42	103 94 94	TAQ	1
haplo-43	103 98 94	ALC	1
haplo-44	104 138 95	PIR	1
Total	35	12	35

4 CONCLUSÃO

- ✓ O presente estudo traz a primeira evidência de baixa diferenciação genética e hibridização em espécies descritas do gênero *Hohenbergia*, o que pode levar a problemas conceituais para definir uma espécie natural.
- ✓ Membros analisados do complexo *ridleyi* apresentam fluxo gênico significativo devido à eficiência da polinização.
- ✓ Os haplótipos dividiram as populações de acordo com o ambiente (Mata Atlântica, restinga e ecótono), com exceção das populações de Pernambuco e a população de Pirambu (Sergipe).
- ✓ As espécies *H. edmundoi*, *H. ramageana*, *H. ridleyi* e *H. salzmanii* correspondem a uma única entidade biológica, a despeito da significativa diferença morfológica que justificou sua descrição.
- ✓ Os tratamentos morfológicos e taxonômicos devem ser revistos, sendo suportados com a definição de novos nomes, para evitar a extinção formal devido à sinonimização de diferentes morfotipos.
- ✓ Cada morfotipo deve ser considerado para conservação.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617-631, Feb. 2008.
- AGUIRRE-SANTORO, J. Taxonomy of the *Ronnbergia* Alliance (Bromeliaceae: Bromelioideae): new combinations, synopsis, and new circumscriptions of *Ronnbergia* and the resurrected genus *Wittmackia*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 303, n. 5, p. 615-640, May 2017.
- ALDHEBIANI, A. Y. Species concept and speciation. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 3, p. 437-440, Mar 2018.
- ANDRADE LIMA, D. Estudos fitogeográficos de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 4, p. 243-274, 2007.
- ANDRADE-LIMA, D. **Esboço fitoecológico de alguns “brejos” de Pernambuco**. Boletim Técnico. Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco, v. 8, p. 3-9, 1966.
- ANDRADE-LIMA, D. Present-day forest refuges in northeastern Brazil. **Biological Diversification in the Tropics**, p. 245-251, 1982.
- ANDRADE-LIMA, D. Tipos de floresta de Pernambuco. **Anais da Associação dos Geógrafos Brasileiros**, v. 2, p. 68-95, 1961.
- ANTONELLI, A et al. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 24, p. 9749-9754, Jun. 2009.
- ANTONELLI, A.; SANMARTÍN, I. Why are there so many plant species in the Neotropics? **Taxon**, v. 60, n. 2, p. 403-414, Apr. 2011.
- AOKI-GONÇALVES, F et al. Microsatellite Loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to neotropical rock outcrops. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1300073, Mar. 2014.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Springer Science & Business Media, 2012.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, 2000.
- BAGSHAW, A. T. M. Functional mechanisms of microsatellite DNA in eukaryotic genomes. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 9, p. 2428-2443, Sep. 2017.
- BALLOUX, F.; LEHMANN, L.; DE MEEÛS, T. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. **Genetics**, v. 164, n. 4, p. 1635-1644, Apr. 2003.

BARACHO, G. S. **Revisão Taxonômica de *Hohenbergia* Schult. & Schult. f. subg. *Hohenbergia* (Bromeliaceae)**. [Dissertação] Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

BARBARÁ, T et al. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 103, n. 1, p. 65-77, Jan. 2009.

BARBARÁ, T.; MARTINELLI, G.; FAY, M. F.; MAYO, S. J.; LEXER, C. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 1981-1992, Dec. 2007.

BARBOSA, A. R.; FIORINI, C. F.; SILVA-PEREIRA, V.; MELLO-SILVA, R.; BORBA, E. L. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 9, p. 1477-1488, Sep. 2012.

BAROW, M.; MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 4, p. 571-584, Apr. 2003.

BARRANDEGUY, M. E.; GARCÍA, M. V. Quantifying genetic diversity: the starting point for population genetic studies using molecular markers. **Journal of Genetics**, v. 93, n. 2, p. 587-589, Aug. 2014.

BAWA, K. S.; PERRY, D. R.; BEACH, J. H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, p. 331-345, Mar. 1985.

BELL, J. M.; KARRON, J. D.; MITCHELL, R. J. Interspecific competition for pollination lowers seed production and outcrossing in *Mimulus ringens*. **Ecology**, v. 86, n. 3, p. 762-771, Aug. 2005.

BELLINTANI, M. C.; ASSIS, J. G. A.; COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P. Chromosomal evolution of Bromeliaceae. **Cytologia**, v. 70, n. 2, p. 129-133, Oct. 2005.

BENGTSSON, B. O. Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 2, p. 189-199, Feb. 2003.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge University Press, 2000.

- BESNARD, G. et al. Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. **Annals of Botany**, v. 101, n. 1, p. 25-30, Nov. 2007.
- BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 250-266, Dec. 2010.
- BOBAY, L.; OCHMAN, H. Biological species are universal across Life's domains. **Genome biology and evolution**, v. 9, n. 3, p. 491-501, 2017.
- BOISSELIER-DUBAYLE, M. C.; LEBLOIS, R.; SAMADI, S.; LAMBOURDIÈRE, J.; SARTHOU, C. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana—a test of the forest refuge hypothesis. **Ecography**, v. 33, n. 1, p. 175-184, 2010.
- BRAGA, R. A. P. et al. Conservação dos recursos hídricos em brejos de altitude – O caso de Brejo dos Cavalos, Caruaru, PE. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 539-546, 2002.
- BRASIL – MMA. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da mata atlântica e campos sulinos**. Conservation International of Brazil, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/Instituto Estadual de Florestas – MG, Brasília, 2000.
- BROWN, A. H. D. Enzyme polymorphism in plant populations. **Theoretical Population Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-42, Feb. 1979.
- BROWN, A. H. D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 52, n. 4, p. 145-157, 1978.
- BROWN, K. S. J. R.; BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. **Tropical Deforestation and Species Extinction**, p. 119-142, 1992.
- BÜNEKER, H. M.; SOARES, K. P.; DE ASSIS, L. C. The *Dyckia sordida* complex (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) and a new species from Minas Gerais, Brazil. **Phytotaxa**, 244(1), 057-068, 2016.
- BURR, B. Some concepts and new methods for molecular mapping in plants. In **DNA-Based Markers in Plants**. Springer Science & Business Media, Dordrecht, p. 1-7, 1994.
- BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v. 28, n. 10, p. 1040-1050, Sep. 2006.

- CABRAL, J. J. P. et al. Recursos hídricos e os brejos de altitude. **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 31-48, 2004.
- CADDAH, M. K. et al. Species boundaries inferred from microsatellite markers in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) and evidence of asymmetric hybridization. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 4, p. 731-741, Jan. 2013.
- CÂMARA, I. G. Brief history of conservation in the Atlantic Forest. Pages 31-42 in Galindo-Leal C and Câmara I de G, editors. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, DC, 2003.
- CANELA, M. B. F.; SAZIMA, M. Florivory by the crab *Armases angustipes* (Grapsidae) influences hummingbird visits to *Aechmea pectinata* (Bromeliaceae). **Biotropica**, v. 35, n. 2, p. 289-294, 2003.
- CANELA, M. B. F.; SAZIMA, M. The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in Southeastern Brazil: ornithophilous versus melittophilous features. **Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 411-416, Feb. 2008.
- CARNAVAL, A. C. et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785-789, Feb. 2009.
- CARSTENS, B. C.; PELLETIER, T. A.; REID, N. M.; SATLER, J. D. How to fail at species delimitation. **Molecular ecology**, 22(17), 4369-4383, 2013.
- CASCANTE-MARÍN, A. et al. Genetic diversity and spatial genetic structure of an epiphytic bromeliad in Costa Rican montane secondary forest patches. **Biotropica**, v. 46, n. 4, p. 425-432, Jun. 2014.
- CAVALCANTI, D.; TABARELLI, M. Distribuição das plantas amazônico-nordestinas no centro de endemismo Pernambuco: brejos de altitude vs. florestas de terras baixas. **Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba. Ministério do Meio Ambiente, Brasília**, p. 285-296, 2004.
- CAVALLARI, M. M. et al. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, selected using RAPD Markers. **Biodiversity and Conservation**, v. 15, n. 14, p. 4357-4373, Sep. 2006.
- CEITA, G. O. et al. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, n. 1, p. 189-193, Sep. 2008.
- CHATTERJEE, B. et al. Significance of Molecular Markers and DNA Based Technology in Research and Standardization of Medicinal Plants: A Review. **International Journal of Research in Medicine**, v. 4, p. 5-16, 2015.

CHENG, H. et al. Screening of new microsatellite DNA markers from the genome of *Platyriocheir formosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 5598-5606, May 2012.

CHISTIAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. A. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 1-29, 2006.

CHOI, S. C. Methods for delimiting species via population genetics and phylogenetics using genotype data. **Genes & Genomics**, v. 38, n. 10, p. 905-915, 2016.

CHOUHARY, S. et al. Microsatellite in Coriander: A Cross Species Amplification within Apiaceae Family. **Internacional Journal Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 5, p. 2714-2721, 2017.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; CHASE, M. W. Biogeographical patterns of plants in the Neotropics—dispersal rather than plate tectonics is most explanatory. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 277-286, 2013.

COLWELL, R. K.; HURTT, G. C. Nonbiological gradients in species richness and a spurious Rapoport effect. **The American Naturalist**, v. 144, n. 4, p. 570-595, Oct. 1994.

COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P. et al. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 173-177, Mar. 2000.

COX, C. B.; MOORE, P. D.; LADLE, R. **Biogeography: an ecological and evolutionary approach**. John Wiley & Sons. 2016.

CRAYN, D. M. et al. Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: phylogenetic and ecological significance of CAM and C3 based on carbon isotope ratios for 1893 species. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, n. 2, p. 169-221, Jun. 2015.

CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3703-3708, Mar. 2004.

CUNHA, N. L.; FISCHER, E. Breeding system of tristylous *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) in the southern Pantanal, Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 280, n. 1-2, p. 53-58, Feb. 2009.

DANTAS, L. G. et al. Low genetic diversity and high differentiation among relict populations of the neotropical gymnosperm *Podocarpus sellowii* (Klotz.) in the Atlantic Forest. **Genetica**, v. 143, n. 1, p. 21-30, 2015.

DE FARIA, A. P. G.; WENDT, T.; BROWN, G. K. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 303-319, 2004.

DEWALD, M. G.; MOORE, G. A.; SHERMAN, W. B. Identification of pineapple cultivars by isozyme genotypes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, USA, 1988.

DEWALD, M. G.; MOORE, G. A.; SHERMAN, W. B. Isozymes in *Ananas* (pineapple): genetics and usefulness in taxonomy. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, n. 3, p. 491-496, Jan. 1992.

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Resources**, v. 3, n. 1, p. 167-169, Jan. 2003.

DISASA, T.; FEYISSA, T.; SERTSE, D. Transferability of Sorghum Microsatellite Markers to Bamboo and Detection of Polymorphic Markers. **The Open Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, Jan. 2016.

DONOGHUE, M. J. et al. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. **Bryologist**, v. 88, n. 3, p. 172-181, 1985.

DUBÉ, C. E. et al. Genetic diversity and differentiation in reef-building *Millepora* species, as revealed by cross-species amplification of fifteen novel microsatellite loci. **PeerJ**, v. 5, p. e2936, Feb. 2017.

DUFRESNES, C. et al. Stronger transferability but lower variability in transcriptomic than in anonymous microsatellites: evidence from Hylid frogs. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 4, p. 716-725, 2014.

EARL, D. A.; VON HOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012.

ELIADES, N. G.; ELIADES, D. G. Haplotype Analysis: software for analysis of haplotype data. **Forest Goettingen (Germany): Genetics and Forest Tree Breeding**, Georg-August University Goettingen. 2009.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435, Jun. 2004.

ELLSTRAND, N. C. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, v. 101, n. 5, p. 737-753, May 2014.

EMANUELLI, F. et al. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 39, Mar. 2013.

EVANNO, G. ; REGNAUT, S. ; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 117693430500100003, Jan. 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FAGUNDES, B. S. et al. Transferability of microsatellite markers among Myrtaceae species and their use to obtain population genetics data to help the conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Tropical Conservation Science**, v. 9, n. 1, p. 408-422, Mar. 2016.

FAROOQ, S. et al. Genetic diversity analysis in the *Hypericum perforatum* populations in the Kashmir valley by using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, Jan. 2014.

FENG, S. et al. Development of pineapple microsatellite markers and germplasm genetic diversity analysis. **BioMed Research International**, v. 2013, Jul. 2013.

FERRAZ, E. M. N. et al. Composição florística em trechos de vegetação de caatinga e brejo de altitude na região do Vale do Pajeú, Pernambuco. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, n. 1, p. 7-15, Apr. 1998.

FERREIRA-NETO, C. A. et al. Effects of fragmentation and anthropic pressure on the genetic structure of *Canthon* (*Peltecanthon*) *staigi* (Coleoptera: Scarabaeidae) populations in the Atlantic Forest domain. **Journal of Insect Conservation**, v. 21, n. 2, p. 267-276, Apr. 2017.

FISHMAN, L.; WYATT, R. Pollinator-mediated competition, reproductive character displacement, and the evolution of selfing in *Arenaria uniflora* (Caryophyllaceae). **Evolution**, v. 53, n. 6, p. 1723-1733, Jul. 1999.

FRANÇA, D. S.; NERES, J.; GAIOTTO, F. A. Development and characterization of 26 microsatellite loci in *Licania hypoleuca* (Chrysobalanaceae) and transferability to *Licania hoehnei*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 59, p. 204-208, 2015.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press, 2002.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2015-2016**. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, e INPE, São José dos Campos, Brasil, 2017.

- GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA I. G. **Atlantic Forest hotspot status: an overview.** The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook, v. 1, p. 3-11, 2003.
- GENTRY, A. H.; DODSON, C. H. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 74, n. 2, p. 205-233, 1987.
- GITAÍ, J. et al. Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, n. 3, p. 349-368, Nov. 2014.
- GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 1-4, p. 65-80, May 2005.
- GIVNISH, T. J. et al. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 55-78, 2014.
- GIVNISH, T. J. et al. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97, n. 4, p. 584-616, Dec. 2010.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, May 2011.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 23, n. 1, p. 3-26, 2007.
- GOETZE, M. et al. Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 194-198, 2013.
- GOETZE, M. et al. Diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae) in the Brazilian Atlantic rainforest: A case study in *Aechmea* subgenus *Ortgiesia*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 98, p. 346-357, May 2016.
- GOETZE, M. et al. East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 477-490, Jul. 2016.
- GOETZE, M. et al. Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 58, p. 204-210, Jan. 2015.

GONÇALVES, F. J. et al. Polymorphism detection by microsatellite markers in a *Magnaporthe oryzae* population from different geographical areas of Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 9, p. 620-630, 2016.

GONÇALVES-OLIVEIRA, R. C. et al. Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. **American Journal of Botany**, v. 104, n. 6, p. 868-878, Jun. 2017.

GONÇALVES-OLIVEIRA, R. C.; WANDERLEY, M. G. L. A new species of *Hohenbergia* (Bromeliaceae) from the Atlantic Forest of Northeast Brazil. **Phytotaxa**, v. 302, n. 3, p. 285-289, 2017.

GONZALEZ-ASTORGA, J. et al. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 94, n. 4, p. 545-551, Oct. 2004.

GOTTLIEB, L. D. Electrophoretic evidence and plant systematics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 64, n. 2, p. 161-180, 1977.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D. **A List of Accepted Bromeliaceae Names** [<http://bromNames.florapix.nl>]. University Botanic Gardens, Utrecht (*accessed: 22-04-2018*) (cont. updated).

GRAVENDEEL, B. et al. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1450, p. 1523-1535, Oct. 2004.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.

GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 4, p. 591-611, Mar. 2011.

HAIDER, N. A Brief Review on Species Concepts with Emphasis on Plants. **LS: International Journal of Life Sciences**, v. 7, n. 3, p. 115-125, 2018.

HANCOCK, J. M. Simple sequences and the expanding genome. **Bioessays**, v. 18, n. 5, p. 421-425, May 1996.

HELLER, S.; LEME, E.; SCHULTE, K.; BENKO-ISEPPON, A. M.; ZIZKA, G. Elucidating phylogenetic relationships in the *Aechmea* alliance: AFLP analysis of *Portea* and the *Gravisia* complex (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Systematic Botany**, v. 40, n. 3, p. 716-725, Sep 2015.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18-33, Mar. 2011.

HEUERTZ, M. et al. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 9, p. 2483-2495, Jun. 2003.

HEUERTZ, M. et al. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). **Evolution**, v. 58, n. 5, p. 976-988, 2004.

HIETZ, P. et al. Breeding systems, fruit set, and flowering phenology of epiphytic bromeliads and orchids in a Mexican humid montane forest. **Selbyana**, p. 156-164, 2006.

HMELJEVSKI, K. V. et al. Development of SSR markers for *Encholirium horridum* (Bromeliaceae) and transferability to other Pitcairnioideae. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 4, Mar. 2013.

HMELJEVSKI, K. V.; DOS REIS, M. S.; FORZZA, R. C. Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* LB Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 1, p. 93-101, Dec. 2014.

HMELJEVSKI, K. V.; NAZARENO, A. G.; BUENO, M. L.; REIS, M. S.; FORZZA, R. C. Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 13, p. 4704-4716, 2017.

Hohenbergia in **Flora do Brasil 2020 under construction**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6096>>. Accessed on: 25 Apr. 2018.

HOORN, C. et al. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**, v. 330, n. 6006, p. 927-931, Nov. 2010.

HUGHES, C. E.; PENNINGTON, R. T.; ANTONELLI, A. Neotropical plant evolution: assembling the big picture. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 1-18, Jan. 2013.

IGIC, B.; LANDE, R.; KOHN, J. R. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 93-104, 2008.

IZQUIERDO, L. Y.; PIÑERO, D. Allozyme divergence among four species of *Podaechmea* s.l. and the status of *Ursulaea* (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 213, n. 3-4, p. 207-215, Sep. 1998.

IZQUIERDO, L. Y.; PIÑERO, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 48, n. 5, p. 645-650, 2000.

JABAILY, R. S.; SYTSMA, K. J. Historical biogeography and life-history evolution of Andean *Puya* (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 201-224, Dec. 2012.

JABAILY, R. S.; SYTSMA, K. J. Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): placement, major lineages, and evolution of Chilean species. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 2, p. 337-356, 2010.

JAIN, S. K.; KARLIN, S. Patterns of survival and microevolution in plant populations. **Population Genetics and Ecology**, p. 49-89, 1976.

KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KAMKE, R. et al. The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 8, p. 749-756, Nov. 2011.

KARANTH, K. P. Species complex, species concepts and characterization of cryptic diversity: vignettes from Indian systems. **Current Science**, v. 112, n. 7, p. 1320-1324, 2017.

KAVAKIOTIS, I. et al. Pattern discovery for microsatellite genome analysis. **Computers in Biology and Medicine**, v. 46, p. 71-78, 2014.

KRAPP, F. et al. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 12, p. e470-e473, 2012.

KRAPP, F.; PINANGÉ, D. S. B.; BENKO-ISEPPON, A. M.; LEME, E. M.; WEISING, K. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 7, 1591-1614, 2014.

KRÖMER, T. et al. Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. **Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 502-511, Jun. 2008.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1111-1115, Mar. 1993.

LAVOR, P.; VAN DEN BERG, C.; JACOBI, C. M.; CARMO, F. F.; VERSIEUX, L. M. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 7, p. 1167-1175, 2014.

LAVOR, P.; VAN DEN BERG, C.; VERSIEUX, L. M. Transferability of 10 nuclear microsatellite primers to *Vriesea minarum* (Bromeliaceae), a narrowly endemic

and threatened species from Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 2, p. 165-168, Jul. 2013.

LEME, E. M. C. Re-establishing *Hohenbergia capitata*. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 60, n. 4, p. 151-158, 2010.

LEMES, M. R. et al. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. **Plant Ecology**, v. 192, n. 2, p. 169-179, Jun. 2007.

LEVIN, D. A. Plant density, cleistogamy, and self-fertilization in natural populations of *Lithospermum caroliniense*. **American Journal of Botany**, p. 71-77, Jan. 1972.

LEVIN, D. A. Reproductive character displacement in *Phlox*. **Evolution**, v. 39, n. 6, p. 1275-1281, Jul. 1985.

LEWONTIN, R. C. et al. **The genetic basis of evolutionary change**. New York: Columbia University Press, 1974.

LEXER, C. et al. Gene flow and diversification in a species complex of *Alcantarea* inselberg bromeliads. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 505-520, Jul. 2016.

LI, Y. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453-2465, Aug. 2002.

LILLANDT, B. G. et al. Brief report Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the *Siberian jay* (*Perisoreus infaustus*). **Hereditas**, v. 137, n. 2, p. 157-160, Oct. 2002.

LINS, R. C. **As áreas de exceção do agreste de Pernambuco**. Sudene, Recife, 1989.

LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S. K. (Ed.). **Conservation genetics**. Birkhäuser, 2013.

LOH, R. et al. Clonality strongly affects the spatial genetic structure of the nurse species *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, n. 2, p. 329-341, Jun. 2015.

LOUZADA, R. B. et al. Chromosome number of *Orthophytum* species (Bromeliaceae). **Kew Bulletin**, v. 65, n. 1, p. 53-58, Jan. 2010.

LUTHER, H. E.; NORTON, K. F. Epiphytism in Bromeliaceae: a synopsis. **Selbyana**, p. 215-216, 2008.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27(2 Part 1), p. 209-220, 1967.

- MARCHANT, C. J. Chromosome evolution in the Bromeliaceae. **Kew Bulletin**, v. 21, n. 1, p. 161-168, 1967.
- MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, p. 209-258, 2008.
- MATALLANA, G. et al. Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution**, v. 289, n. 1-2, p. 57-65, Jul. 2010.
- MATALLANA, G. et al. Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 521-531, Jul. 2016.
- MAXTED, N.; FORD-LLOYD, B. V.; HAWKES, J. G. **Plant genetic conservation: the in situ approach**. Springer Science & Business Media, 2013.
- MAYDEN, R. L. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson (eds.), **Species: The units of diversity**. Chapman & Hall. p. 381–423.7, 1997.
- MAYO, S. J.; FEVEREIRO, V. P. B. Mata do Pau-Ferro: a pilot study of the brejo forest of Paraíba, Brazil. **Royal Botanic Gardens**, Kew, 1982.
- MAYR, E. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, 1963.
- MAYR, E. Species concepts and definitions. **Topics in the Philosophy of Biology**. Springer, Dordrecht, p. 353-371, 1976.
- MCCAULEY, D. E. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 17, p. 8127-8131, 1994.
- MCCLINTOCK, K. A.; WATERWAY, M. J. Patterns of allozyme variation and clonal diversity in *Carex lasiocarpa* and *C. pellita* (Cyperaceae). **American Journal of Botany**, p. 1251-1263, Nov. 1993.
- MENDES, S. P. et al. A case of male sterility in the endangered endemic species *Pitcairnia encholirioides* LB Sm. (Bromeliaceae) of Brazilian Atlantic Forest Inselbergs. **International Journal of Plant Sciences**, v. 177, n. 6, p. 498-510, May 2016.
- MÉTAIS, I. et al. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 8, p. 1346-1352, Aug. 2002.

METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Research**, v. 10, n. 1, p. 72-80, 2000.

MICHAELS, S. D.; JOHN, M. C.; AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **BioTechniques**, v. 17, n. 2, p. 274-276, 1994.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: the Brazilian atlantic forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 786-792, 2000.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 194, Jan. 2002.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 10, p. 389-394, Oct. 1999.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853, Feb. 2000.

NUNES, A. C. P.; CLARINDO, W. R. Karyotype characterization and nuclear DNA content measurement in Bromeliaceae: State of the art and future perspectives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1849-1862, Dec. 2014.

NYBOM, H.; WEISING, K.; ROTTER, B. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. **Investigative Genetics**, v. 5, n. 1, p. 1, Jan. 2014.

OLÁH, J. Unified phylogenetic species concept: taking subspecies and race out of science: postmodern theory applied to the *Potamophylax cingulatus* group (Trichoptera, Limnephilidae). **Opuscula Zoologica (Budapest)**, 49(1), 33-70, 2018.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, Marco Aurélio L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 793-810, Jan. 2000.

OLMSTEAD, R. G.; PALMER, J. D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. **American Journal of Botany**, p. 1205-1224, Sep. 1994.

PAGGI, G. M. et al. Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) in southern Brazil. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 4, p. 683-689, Apr. 2007.

PAGGI, G. M. et al. 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**, v. 8, n. 5, p. 980-982, Jan. 2008.

PAGGI, G. M. et al. Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic forest bromeliad. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 211, p. 1-10, 2015.

PAGGI, G. M. et al. Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. **Plant Species Biology**, v. 28, n. 3, p. 169-76, Sep 2013.

PALMA-SILVA, C. et al. Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Botany**. V. 91, n. 6, p. 804-7, Jun. 2004.

PALMA-SILVA, C. et al. Meiotic behavior and pollen viability of wild populations of the neotropical species *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). **Plant Species Biology**, v. 23, n. 3, p. 217-21, Dec. 2008.

PALMA-SILVA, C. et al. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, v. 103, n. 6, p. 503, 2009.

PALMA-SILVA, C. et al. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 15, p. 3185-3201, 2011.

PALMA-SILVA, C., et al. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 654-7, Jul. 2007.

PALMA-SILVA, C., et al. Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 305-22 Jul. 2016.

PALMA-SILVA, C.; FAY, M. F. Bromeliaceae in focus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 179, p. 215–217, Sep. 2015.

PAUSAS, J. G.; AUSTIN, M. P. Patterns of plant species richness in relation to different environments: an appraisal. **Journal of Vegetation Science**, v. 12, n. 2, p. 153-166, 2001.

PENNINGTON, R. T. et al. Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1443, p. 515-538, Feb. 2004.

- PEREIRA FILHO, G. A.; MONTINGELLI, G. G. Check list of snakes from the Brejos de Altitude of Paraíba and Pernambuco, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 3, p. 145-151, Jul./Sep. 2011.
- PESSOA, E.; ALVES, M. Synopsis of Orchidaceae from Serra do Urubu: an area of montane forest, Pernambuco State, Brazil. **Hoehnea**, v. 42, n. 1, p. 109-133, Mar. 2015.
- PINANGÉ, D. S. B. et al. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2 nov. 2016.
- PINHEIRO, L. R. et al. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 10, p. 1815-1825, Aug. 2012.
- PINZÓN, J. P. et al. Phylogenetics and evolution of the *Tillandsia utriculata* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) inferred from three plastid DNA markers and the ETS of the nuclear ribosomal DNA. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 181(3), 362-390, 2016.
- PITA, P. B.; MENEZES, N. L. Root anatomy in species of *Dyckia* Schult. f. and *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) from Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil), with special emphasis to velamen. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, n. 1, p. 25-34, Mar. 2002.
- PITMAN, N. C. A.; JØRGENSEN, P. M. Estimating the size of the world's threatened flora. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 989-989, Nov. 2002.
- PLEASANTS, J. M.; WENDEL, J. F. Genetic diversity in a clonal narrow endemic, *Erythronium propullans*, and in its widespread progenitor, *Erythronium albidum*. **American Journal of Botany**, p. 1136-1151, Aug. 1989.
- PÔRTO, K. C.; GERMANO, S. R.; BORGES, G. M. Avaliação dos brejos de altitude de Pernambuco e Paraíba, quanto à diversidade de briófitas, para a conservação. **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**, p. 79-97, 2004.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 7, p. 215-222, Jul. 1996.
- PRANCE, G. T. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 594-624, 1982.
- PRIMMER, C. R.; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, v. 3, n. 4, p. 445-449, 2002.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population

structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 3, p. 142-147, Nov. 2001.

QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

R CORE TEAM. **A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2017.

RAI, M. K. et al. Cross species transferability and characterization of microsatellite markers in *Prosopis cineraria*, a multipurpose tree species of Indian Thar Desert. **Arid Land Research and Management**, v. 31, n. 4, p. 462-471, Aug. 2017.

RAMÍREZ-MORILLO, I. M. et al. It takes two to tango: self-incompatibility in the bromeliad *Tillandsia streptophylla* (Bromeliaceae) in Mexico. **Revista de Biologia Tropical**, v. 57, n. 3, p. 761-770, Sep. 2009.

RAMÍREZ-MORILLO, I. M.; BROWN, Gregory K. The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). **Systematic Botany**, v. 26, n. 4, p. 722-726, Oct. 2001.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP Version 1.2: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, p. 248–249, 1995.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, Mar. 2009.

RIBEIRO, P. C. C. et al. Genetic diversity of *Vriesea cacuminis* (Bromeliaceae): an endangered and endemic Brazilian species. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1934–1943, 2013.

RODAL, M. J. N. et al. Flora de um Brejo de Altitude na escarpa oriental do planalto da Borborema, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 4, p. 843-858, May 2005.

RODRIGUES, M. T. The conservation of Brazilian reptiles: challenges for a megadiverse country. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 659-664, Jan. 2005.

ROGSTAD, S. H. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. **Taxon**, p. 701-708, 1992.

ROSA, R. S.; GROTH, Fernando. Ictiofauna dos ecossistemas de brejos de altitude de Pernambuco e Paraíba. **Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: História Natural, Ecologia e Conservação. Série Biodiversidade**, v. 9, p. 201-210, 2004.

SAHU, J. et al. E-microsatellite markers for *Centella asiatica* (Gotu Kola) genome: validation and cross-transferability in Apiaceae family for plant omics research and development. **Omics: a Journal of Integrative Biology**, v. 19, n. 1, p. 52-65, 2015.

SAJO, M. G.; RUDALL, P. J.; PRYCHID, C. J. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. **Plant Systematics and Evolution**, v. 247, n. 3-4, p. 215-231, Jun. 2004.

SANTIAGO, A. C. P.; BARROS, I. V. L.; SYLVESTRE, L. S. Pteridófitas ocorrentes em três fragmentos florestais de um brejo de altitude (Bonito, Pernambuco, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 781-792, Apr. 2004.

SARGENT, R. D.; ACKERLY, D. D. Plant–pollinator interactions and the assembly of plant communities. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 3, p. 123-130, 2008.

SARTHOU, C. et al. Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* LB Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. **Molecular Ecology Resources**, v. 3, n. 2, p. 221-223, Feb. 2003.

SARTHOU, C.; SAMADI, S.; BOISSELIER-DUBAYLE, M. C. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 5, p. 861-868, 2001.

SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 2, p. 559-571, May 2010.

SCHMID, S. et al. Diversity of flower visitors and their role for pollination in the ornithophilous bromeliad *Vriesea friburgensis* in two different habitats in southern Brazil. **Ecotropica**, v. 17, n. 1, p. 91-102, 2011.

SCHOEN, D. J.; BUSCH, J. W. On the evolution of self-fertilization in a metapopulation. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 119-127, 2008.

SCHULTE, K.; BARFUSS, M. H. J.; ZIZKA, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 2, p. 327-339, Feb. 2009.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 25, Nov. 2006.

SGORBATI, S. et al. A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. **Plant Biology**, v. 6, n. 2, p. 222-230, Jan. 2004.

SHEU, Y. et al. Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 16, n. 2, 2017.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. CABS and Island Press, Washington, p. 43-59, 2003.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. **Nature**, v. 404, n. 6773, p. 72, Mar. 2000.

SILVERTOWN, J. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 157-168, 2008.

SILVESTRO, D.; ZIZKA, G.; SCHULTE, K. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). **Evolution**, v. 68, n. 1, p. 163-175, 2014.

SIMON, M. F. et al. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20359-20364, Mar. 2009.

SINGH, R. K. et al. **Molecular plant breeding: principle, method and application**. Studium Press LLC, 2010.

SIQUEIRA-FILHO, J. A. As bromélias nos Brejos de Altitude em Pernambuco: riqueza de espécies e status de conservação. **Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: História Natural, Ecologia e Conservação**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 99-110, 2004.

SIQUEIRA-FILHO, J. A. et al. Fragmentos da Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas e suas bromélias: distribuição, composição riqueza e conservação. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste. Biodiversidade, Conservação e suas Bromélias**. Andrea Jakobson Estúdio, Rio de Janeiro, p. 101-131, 2006.

SIQUEIRA-FILHO, J. A.; LEME, E. M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: biodiversidade, conservação e suas bromélias**. Andrea Jakobsson Estúdio, 2006.

SIQUEIRA-FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. Biologia floral de *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. **Bromélia**, v. 5, n. 1-4, p. 3-13, 1998.

SIQUEIRA-FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. Síndromes de polinização de uma comunidade de Bromeliaceae e biologia floral de *Vriesea psittacina* (Hooker) Lindley (Bromeliaceae) em Brejo dos Cavalos, Caruaru, Pernambuco. **Brejos de**

Altitude em Pernambuco e Paraíba-História Natural, Ecologia e Conservação (KC Porto, JJP Cabral & M. Tabarelli, orgs.). Ministério do Meio Ambiente, Brasília. p. 227-84, 2004.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787–792, 1987.

SMITH, J. A. C. Epiphytic bromeliads. In **Vascular plants as epiphytes**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1989.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromeliaceae subfamily Pitcairnioideae. **Flora Neotropica**, v. 14, p. 1-33, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromeliaceae, subfamily Bromelioideae. **Flora Neotropica**, v. 14, n. 2, p. 1493-2142, 1979.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**, 1977.

SMITH, L. B.; TILL, W. Bromeliaceae. In: **Flowering Plants- Monocotyledons**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 74-99, 1998.

SMITH, R. A.; RAUSHER, M. D. Close clustering of anthers and stigma in *Ipomoea hederacea* enhances prezygotic isolation from *Ipomoea purpurea*. **New Phytologist**, v. 173, n. 3, p. 641-647, Nov. 2007.

SOARES, L. E. et al. Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 308–317, 2018.

SOKAL, R. R.; CROVELLO, T. J. The biological species concept: a critical evaluation. **The American Naturalist**, v. 104, n. 936, p. 127-153, 1970.

SOLTIS, D. E. et al. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, p. 531-537, Apr. 1987.

SOS Mata Atlântica. Mapa de remanescentes da floresta Atlântica nordestina, in: Sociedade Nordestina de Ecologia, Conservation International & Fundação Biodiversitas (eds.) **Workshop Prioridades para a Conservação da Floresta Atlântica do Nordeste**. Recife, 1993.

SOUSA, M. A. N.; LANGGUTH, A.; AMARAL, G. E. Mamíferos dos brejos de altitude Paraíba e Pernambuco. **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**, p. 229-254, 2004.

SQUIRRELL, J. et al. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology**, v. 12, n. 6, p. 1339-1348, Jan. 2003.

STEBBINS, G. L. Self fertilization and population variability in the higher plants. **The American Naturalist**, v. 91, n. 861, p. 337-354, Nov./Dec. 1957.

TABARELLI, M. et al. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695-700, Jun. 2005.

TABARELLI, M.; SANTOS, A. M. M. Uma breve descrição sobre a história natural dos brejos nordestinos. **Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba, História Natural, Ecologia e Conservação**, v. 9, p. 17-24, 2004.

TABERLET, P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant molecular biology**, v. 17, n. 5, p. 1105-1109, Jul. 1991.

TOKUDA, M.; MARTINS, M. M.; IZAR, P. Transferability of microsatellites for studies on the social behavior of the tufted capuchin monkey (genus *Sapajus*). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9910-9914, Nov. 2014.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, n. 7, p. 967-981, 2000.

VAMOSI, J. C.; VAMOSI, S. M. Factors influencing diversification in angiosperms: at the crossroads of intrinsic and extrinsic traits. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 460-471, Mar. 2011.

VAN DER PIJL, L. **Principles of dispersal in higher plants**. 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin. 1982.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

VARSHNEY, R. K. et al. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 7, n. 2A, p. 537-546, May 2002.

VERSIEUX, L. M. ; WENDT, T.; LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. G. L. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 98-110, dez. 2008.

VOSGUERITCHIAN, S. M.; BUZATO, S. Sexual reproduction of *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) and plant-animal interaction. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n. 3, p. 433-442, 2006.

WAPLES, R. S. Testing for Hardy–Weinberg proportions: have we lost the plot? **Journal of Heredity**, v. 106, n. 1, p. 1–19, 2015

WEISING, K.; GARDNER, R. C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, v. 42, n. 1, p. 9–19, 1999.

WEISING, K.; NYBOM, H.; PFENNINGER, M.; WOLFF, K.; KAHL, G. **DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications**. CRC Press, 2005.

WENDT, T. et al. An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, n. 1-2, p. 31, Jul. 2008.

WÖHRMANN, T. et al. Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 4, Apr. 2012.

WÖHRMANN, T.; WEISING, K. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 4, p. 635–647, 2011.

ZACHOS, F. E. Mammals and meaningful taxonomic units: the debate about species concepts and conservation. **Mammal review**, v. 48, n. 3, p. 153-159, 2018.

ZACHOS, F. E. Taxonomic inflation, the phylogenetic species concept and lineages in the tree of life—a cautionary comment on species splitting. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 53, n. 2, p. 180-184, 2015.

ZANELLA, C. M. et al. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 98, n. 9, p. 1511-1519, 2011.

ZANELLA, C. M. et al. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 1020-1026, 2012.

ZANELLA, C. M. et al. Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 491-504, Jul. 2016.

ZHANG, D.; HEWITT, G. M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 3, p. 563-584, 2003.

ZHANG, Y. et al. Development of microsatellite markers derived from expressed sequence tags of Polyporales for genetic diversity analysis of endangered *Polyporus umbellatus*. **BioMed Research International**, v. 2015, May 2015.

ZUCCHI, M. I. et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 449-457, Dec. 2003.

ZUCCHI, M. I. et al. Padrão espacial de divergência em populações de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores microssatélites. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 29-38, Dez. 2004.