



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ANTÔNIA LARISSA DA SILVA MAIA

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E ESTRUTURA GENÉTICA DO
COMPLEXO *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (BROMELIACEAE)**

RECIFE-PE

2023

ANTÔNIA LARISSA DA SILVA MAIA

**DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E ESTRUTURA GENÉTICA DO
COMPLEXO *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (BROMELIACEAE)**

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

Área de concentração: Sistemática e Evolução.
Linha de pesquisa: Florística e Sistemática de Angiospermas.

Orientador: Dr. Rafael Batista Louzada

Coorientadora: Dra. Débora Maria Cavalcanti Ferreira

RECIFE-PE

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Maia, Antônio Larissa da Silva.

Delimitação de espécies e estrutura e genética do complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (BROMELIACEAE). / Recife. – 2023.

115f. : il., fig.

Orientador: Rafael Batista Louzada.

Coorientador: Débora Maria Cavalcanti Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia vegetal, 2023.

Inclui referências.

1. *Cryptanthus pickelii*. 2. Diversidade biológica. 3. Floresta Atlântica. 4. Genética de Populações. 5. Microsatélites nucleares. 6. Morfometria. I. Louzada, Rafael Batista. (Orient.). II. Ferreira, Débora MARIA Cavalcanti (Coorient.). III. Título.

ANTÔNIA LARISSA DA SILVA MAIA

DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E ESTRUTURA GENÉTICA DO
COMPLEXO *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (BROMELIACEAE)

Aprovada em: 31/07/2023

Dissertação apresentada à Banca Examinadora:

Rafael Batista Louzada -UFPE
Orientador

Bárbara Simões Santos Leal - ITV
1º Examinador

Diego Sotero de Barros Pinangé - UFAM
2º Examinador

RECIFE-PE

2023

*Aos meus pais, Maria José da Silva Maia e
Francisco José Duarte Maia, por serem
exemplos de força e coragem.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Rafael Louzada, pela atenção, auxílio, confiança e partilha ao longo desses dois anos de mestrado.

À minha coorientadora, Débora Ferreira, por toda disposição, ensinamento e parceria em todas as etapas do projeto. Especialmente por todas as discussões levantadas, dúvidas tiradas, e informações sobre o gênero *Cryptanthus*. Além de todo auxílio nas coletas, no laboratório e na análise dos dados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

Aos responsáveis pelas unidades de conservação visitadas, pela ajuda durante a coleta das populações amostradas.

Ao Joilson Viana e Deibson Belo, por toda ajuda nas análises morfométricas.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Prospeção e Gestão da Biodiversidade do Nordeste (NPGBIO - UFPE), em especial à Izabel Paiva, pela contribuição e discussões importantes durante os testes de amplificação e genotipagem das amostras.

À Heidi Lacerda, Bruno Sampaio e Santelmo Vasconcelos por toda disponibilidade durante a etapa da genotipagem.

A todos os meus amigos do Laboratório de Morfo-Taxonomia e Evolução Vegetal (Amanda Bezerra, Larissa Moraes, Yuri Rossine, Izabel Paiva, Joilson Viana, William Matzenauer, Gustavo Gomes, Emanuel Evaristo, Alessandro Soares, Yuri Couceiro e Aline Belém) por todas as discussões levantadas, pelas inúmeras experiências de convivência e por dividirem comigo momentos únicos que tornaram os meus dias bem melhores.

À banca das disciplinas de Projetos (Santelmo Vasconcelos e Bárbara Leal), de Seminários integrados (Jefferson Maciel e Jordana Neri), da Qualificação (Bárbara Leal e Gustavo Souza) e da Defesa de Mestrado (Bárbara Leal e Diego Sotero), por toda contribuição dada nas diferentes etapas da dissertação.

A todos os professores do PPGBV, por todo ensinamento e contribuições.

Aos meus grandes amigos da graduação (Alane Pastor, Amanda Bezerra, Byanca Cavalcante, Eduarda Cavalcante, Matheus Bessa, Wesley Araújo, Eveline Belém e Emília Uchôa) por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

Aos meus pais, Maria José Maia e Francisco Duarte Maia, que sempre estiveram do meu lado e não mediram esforços para ajudar no que fosse preciso. Agradeço por todos os

ensinamentos, amor e proteção. Obrigada por acreditarem em mim e por serem meus maiores incentivadores e admiradores.

Aos meus irmãos (Alex Maia, Fabiano Maia, Thiago Maia e José Neto Maia) por serem os meus maiores exemplos de seres humanos.

Aos meus sobrinhos, por sempre me receberem em casa com a maior alegria do mundo e por fazerem os meus dias mais felizes.

Ao Lucas Medeiros, por todo amor, compreensão, companheirismo e força.

A todos que não tiveram o nome aqui listado, mas que contribuíram de alguma forma para que esse momento fosse possível.

Obrigada!

“Que as coisas são inatingíveis? Ora! Isso não é motivo para não querê-las. Que tristes seriam os caminhos sem a presença distante das estrelas.”

- Mario Quintana

RESUMO

O gênero *Cryptanthus* Otto & A.Dietr. (Bromeliaceae - Bromelioideae) é endêmico do Brasil, e inclui 68 espécies distribuídas ao longo da costa leste do país. *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm., *C. alagoanus* Leme & J.A. Siqueira e *C. pirambuensis* D.M.C. Ferreira & Louzada estão restritas à Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro e apresentam sobreposição de caracteres morfológicos que contribuem para que os limites interespecíficos não sejam bem definidos, classificando-as em um complexo de espécies. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo realizar a delimitação das espécies, por meio de parâmetros morfométricos, e da análise e caracterização da estrutura e diversidade genética. Para isso, foram realizados teste de amplificação cruzada em *C. pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*, utilizando 17 locos de microssatélites nucleares desenvolvidos originalmente para espécies de diferentes subfamílias de Bromeliaceae. Dos 17 locos testados, nove foram polimórficos, e quatro foram selecionados para amplificação e genotipagem em seis populações do complexo. Análises morfométricas multivariadas de 24 caracteres vegetativos e reprodutivos foram realizadas em 82 indivíduos. Os resultados morfométricos mostraram quatro morfotipos, evidenciando que atualmente existem três entidades biológicas sendo tratadas sob um mesmo nome (*C. alagoanus*). A análise bayesiana dos SSR apresentou três grupos mais prováveis. *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* são dois nomes dados à mesma espécie. Foi detectado uma estruturação genética distinta em duas populações de *C. alagoanus*, onde uma população passa a ser considerada como *C. pickelii*, e outra está em processo de especiação híbrida com *C. zonatus*. Esses resultados mostram a importância da hibridação para entendimento das relações evolutivas responsáveis pela diversificação e especiação em Bromeliaceae. Onde a integração das técnicas morfométricas e moleculares teve implicações significativas sobre a taxonomia e conservação dessas espécies, indicando populações prioritárias para o estabelecimento de unidades de conservação.

Palavras-chave: Amplificação cruzada, *Cryptanthus pickelii*, Diversidade biológica, Floresta Atlântica, Genética de populações, Microssatélites nucleares, Morfometria.

ABSTRACT

The genus *Cryptanthus* Otto & A.Dietr. (Bromeliaceae - Bromelioideae) is endemic to Brazil, and includes 68 species distributed along the east coast of the country. *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm., *C. alagoanus* Leme & J.A. Siqueira and *C. pirambuensis* D.M.C. Ferreira & Louzada are restricted to the Atlantic Forest of Northeastern Brazil and have overlapping morphological characters that contribute to the interspecific boundaries not being well defined, classifying them into a species complex. In view of this, the present study aims to carry out the delimitation of the species, through morphometric parameters, and analysis and characterization of genetic structure and diversity. For this, cross amplification tests were carried out in *C. alagoanus*, *C. pickelii* and *C. pirambuensis*, using 17 nuclear microsatellite loci originally developed for species from different subfamilies of Bromeliaceae. From 17 loci tested, nine were polymorphic, and four were selected for amplification and genotyping in six populations of the complex. Multivariate morphometric analyses of 24 vegetative and reproductive characters were performed on 82 individuals. The morphometric results revealed four morphotypes, indicating that currently three biological entities are being treated under the same name (*C. alagoanus*). The Bayesian analysis of SSRs presented three most likely groups. *C. alagoanus* and *C. pirambuensis* were identified as two names given to the same species. Distinct genetic structuring was detected in two populations of *C. alagoanus*, with one population being classified as *C. pickelii*, and the other undergoing hybrid speciation with *C. zonatus*. These results highlight the importance of hybridization in understanding the evolutionary relationships responsible for diversification and speciation in Bromeliaceae. The integration of morphometric and molecular techniques had significant implications for the taxonomy and conservation of these species, identifying priority populations for the establishment of conservation units.

Keywords: Atlantic Forest, Cross-amplification, *Cryptanthus pickelii*, Biological diversity, Population genetics, Nuclear microsatellites, Morphometry.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Distribuição geográfica das populações amostradas no complexo de espécies *Cryptanthus pickelii* ao longo da Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro.....52

CAPÍTULO II

Figura 1. Distribuição geográfica do complexo *Cryptanthus pickelii* ao longo da Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil. Populações coletadas: Mamanguape – PB (MAM) – *Cryptanthus alagoanus*, Aldeia - PE (ALD) – *C. pickelii*, São Lourenço da Mata – PE (SLM) – *C. pickelii*, Ipojuca – PE (IPO) – *C. alagoanus*, Paripueira – AL (PAR) – *C. alagoanus* e Pirambu – SE (PIR) *C. pirambuensis*.....89

Figura 2. Seis populações amostradas no complexo *Cryptanthus pickelii*. **A** - *C. pickelii* em Aldeia - PE. **B** - *C. pickelii* em São Lourenço da Mata - PE. **C** - *C. alagoanus* em Paripueira - AL. **D** - *C. alagoanus* em Mamanguape - PB. **E** - *C. alagoanus* em Ipojuca - PE. **F** - *C. pirambuensis* em Pirambu - SE.....90

Figura 3. Gráfico Box plot representando as discontinuidades e semelhanças para cada estrutura vegetativa medida nas seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.....91

Figura 4. Gráfico Box plot representando as discontinuidades e semelhanças para cada estrutura reprodutiva medida nas seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.....92

Figura 5. Análise de componentes principais (PCA), baseada em 24 caracteres morfológicos de indivíduos de seis populações (ALD – Aldeia, IPO – Ipojuca, MAM – Mamanguape, PAR

– Paripueira, PIR – Pirambu e SLM – São Lourenço da Mata) do complexo de espécie *Cryptanthus pickelii* (Bromeliaceae).....93

Figura 6. Dendrograma demonstrando a análise de cluster baseada em 24 caracteres morfológicos de indivíduos de seis populações do complexo de espécies *Cryptanthus pickelii* (Bromeliaceae).....94

Figura 7. Magnitude do Delta K da análise de estrutura genética para os dados de microssatélites nucleares em seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*. O melhor valor de K foi calculado pelo método proposto por Evanno *et al.* (2005). O valor dessas distribuições indica o K mais provável, sendo o K=3 (três agrupamentos genéticos)95

Figura 8. Proporção de mistura (Q) para cada indivíduo do complexo *Cryptanthus pickelii*, com base no número de agrupamentos mais provável K=3 (três agrupamentos genéticos). Os três agrupamentos genéticos identificados pelo STRUCTURE estão indicados em cores diferentes. As seis populações estão separadas por barras verticais.....96

Figura 9. Gráfico de dispersão representando a correlação do teste de Mantel para a distância genética e distância geográfica (p-value=0.267; $r^2=0.0479$).....97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Localização e coordenadas geográficas das seis populações amostradas do complexo de espécies *Cryptanthus pickelii*.....53

Tabela 2. Amplificação cruzada de 17 marcadores microssatélites nucleares originalmente desenvolvidos para três subfamílias de Bromeliaceae e testados em *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*.....54

Tabela 3. Estimativa da diversidade genética para seis locos polimórficos de nuSSR desenvolvidos para outras espécies de Bromeliaceae e transferidos para *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*.....55

CAPÍTULO II

Tabela 1. Código da População (POP), estados (UF), município, localidade, coordenadas geográficas, número amostral (N) e comprovante de espécimes coletados nas seis populações amostradas do complexo de espécies *Cryptanthus pickelii* (Voucher).....98

Tabela 2. Comparação de caracteres diagnósticos e distribuição geográfica que diferencia *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*99

Tabela 3. Medidas morfométricas de indivíduos de seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*. Centímetros (cm), média (\bar{x}), desvio padrão (DS), mínimo (mín) e máximo (max) para os espécimes examinados das populações de Aldeia (ALD), Ipojuca (IPO), Mamanguape (MAM), Paripueira (PAR), Pirambu (PIR) e São Lourenço da Mata (SLM).....100

| | |
|--|-----|
| Tabela 4. Teste de Kruskal-Wallis para 24 caracteres morfológicos utilizados na análise morfométrica para indivíduos de seis populações do complexo de espécies <i>Cryptanthus pickelii</i> (Bromeliaceae)..... | 102 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 5. Comparações pareadas usando o teste de Wilcoxon para os caracteres vegetativos de seis populações do complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> | 103 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabela 6. Comparações pareadas usando o teste de Wilcoxon para os caracteres reprodutivos de seis populações do complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> | 105 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 7. Comparações pareadas usando análise de variância multivariada (MANOVAs) com 9999 permutações em uma matriz de distância sobre os caracteres analisados em seis populações do complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> | 107 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabela 8. Caracterização de seis populações do Complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> através de seis microsatélites nucleares, incluindo o tamanho das amostras (N), número de clones (NC), número de alelos (A), número de alelos privados (PA), riqueza alélica (AR), variância no tamanho do alelo (Var), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}). Populações: Pirambu – Sergipe (PIR-SE); Paripueira – Alagoas (PAR-AL); São Lourenço da Mata – Pernambuco (SLM-PE); Ipojuca – Pernambuco (IPO-PE); Aldeia – Pernambuco (ALD-PE); Mamanguape – Paraíba (MAM-PB)..... | 108 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabela 9. Estimativa de fluxo gênico com base no número efetivo de migrantes (N_{em}) para pares de subpopulação do complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> , estimado conforme Beerli & Felsenstein (1999) no <i>software</i> MIGRATE v.3.0.3..... | 109 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 10. Análise de variância molecular (AMOVA) para microssatélites nucleares usados no complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> | 110 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 11. Valor de K estimado para 20 repetições em análise de estrutura genética de microssatélites nucleares para seis populações do complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> , de acordo com o método proposto por Evanno <i>et al.</i> (2005)..... | 111 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabela 12. Média das proporções dos grupos genéticos (coeficiente de membership) para as seis populações do complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> | 112 |
|---|-----|

Sumário

| | |
|--|------------|
| 1. APRESENTAÇÃO..... | 16 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 17 |
| 2.1. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA FAMÍLIA BROMELIACEAE | 17 |
| 2.2. O GÊNERO <i>Cryptanthus</i> | 19 |
| 2.3. O COMPLEXO <i>Cryptanthus pickelii</i> | 21 |
| 2.4. TAXONOMIA INTEGRATIVA NA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES | 23 |
| 2.4.1. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS..... | 24 |
| 2.4.2. ESTUDOS MOLECULARES..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS..... | 27 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |
| CAPÍTULO I - Transferibilidade de marcadores SSR nucleares para três espécies de <i>Cryptanthus</i> Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae) | 37 |
| RESUMO..... | 39 |
| INTRODUÇÃO | 40 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 45 |
| AGRADECIMENTOS | 46 |
| REFERÊNCIAS..... | 47 |
| CAPÍTULO II – Delimitação de espécies e estrutura genética do complexo <i>Cryptanthus pickelii</i> L.B.Sm. (Bromeliaceae)..... | 56 |
| RESUMO..... | 58 |
| INTRODUÇÃO | 59 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 61 |
| RESULTADOS | 67 |
| AGRADECIMENTOS | 78 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| CONCLUSÕES..... | 113 |
| ANEXOS | 114 |

1. APRESENTAÇÃO

O gênero *Cryptanthus* Otto & A.Dietr. (Bromeliaceae - Bromelioideae) é endêmico do Brasil, e inclui 68 espécies distribuídas ao longo da costa leste do país, com centro de diversidade na Floresta Atlântica. *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm., *Cryptanthus alagoanus* Leme & J.A. Siqueira e *Cryptanthus pirambuensis* D.M.C. Ferreira & Louzada estão restritas a Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro e apresentam sobreposição de caracteres morfológicos que contribuem para que os limites interespecíficos não sejam bem definidos, classificando-as assim, em um complexo de espécies. Frente a dificuldade de delimitação taxonômica das espécies supracitadas, o presente estudo tem como objetivo contribuir com uma nova proposta de delimitação das espécies que compõem o complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm, por meio de técnicas morfométricas e moleculares.

Dessa forma, a dissertação está dividida em três partes: Fundamentação Teórica, Capítulo I e Capítulo II. Especificamente na Fundamentação Teórica, serão apresentados tópicos com informações acerca da família Bromeliaceae, do gênero *Cryptanthus* e do complexo *Cryptanthus pickelii*, além uma abordagem sobre o papel da taxonomia integrativa na delimitação de espécies, com um enfoque maior para os estudos morfométricos e moleculares.

O capítulo I, referente ao manuscrito “Transferibilidade de marcadores SSR nucleares para três espécies de *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae)”, apresenta os resultados do teste de amplificação heteróloga utilizando 17 locos de marcadores microssatélites nucleares desenvolvidos originalmente para diferentes espécies de Bromeliaceae, e analisados em *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*.

Para o capítulo II, intitulado como “Delimitação de espécies e estrutura genética do complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (Bromeliaceae)”, foram agrupados dados sobre as análises morfométricas, estrutura e diversidade genética de seis populações do complexo de espécies estudado, com o objetivo de testar a hipótese de que *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* fazem parte de uma mesma espécie, apresentando restrição no fluxo gênico populacional, interferindo na variação dos caracteres morfológicos de acordo com as adaptações ao ambiente.

O manuscrito referente ao capítulo I será submetido para publicação no periódico *Brazilian Journal of Botany*, e o capítulo II será submetido no *Botanical Journal of the Linnean Society*. As normas para publicação destes dois periódicos estão disponíveis no final da dissertação (Anexos).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA FAMÍLIA BROMELIACEAE

Bromeliaceae Juss., incluída na ordem Poales (APG IV 2016), é uma das maiores famílias de monocotiledôneas, sendo monofilética e altamente diversa em termos de morfologia, fisiologia, hábito, hábitat e interação animal-planta (Givnish *et al.* 2011). Compreende 79 gêneros, com aproximadamente 3680 espécies (Gouda *et al.* cont. upd). Tradicionalmente, com base em caracteres morfológicos, Smith & Downs (1974; 1977; 1979) haviam dividido Bromeliaceae em apenas três subfamílias: Pitcairnioideae (frutos secos com sementes aladas), Bromelioideae (frutos carnosos com sementes inapendiculadas), e Tillandsioideae (frutos secos com sementes plumosas). Entretanto, estudos filogenéticos de Givnish *et al.* 2007, apontaram o antigo grupo Pitcairnioideae como parafilético. Essas evidências filogenéticas indicaram que a família está organizada em oito subfamílias, sendo elas: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae.

Bromeliaceae surgiu como plantas terrestre C3 há cerca de 100 milhões de anos (Ma.), no Escudo das Guianas, onde se diversificaram (19Ma.) e colonizaram as demais áreas do continente por volta de 15.4Ma., alcançando a África Ocidental por meio de dispersão de longa distância (9.3Ma.) (Givnish *et al.* 2007; Givnish *et al.* 2011). Como apontado por Givnish (2007; 2011), dois terços das bromélias existentes pertencem a dois grandes eventos de radiação adaptativa, que ocorreu em torno de 14,2 e 9,1Ma., favorecendo, principalmente, a evolução do epifitismo e da fotossíntese CAM. Há aproximadamente 10Ma., surgiu o grupo das Bromelioideae. Já *Cryptanthus*, gênero alvo deste estudo, é ainda mais recente, com cerca de 5,5 Ma. (Givnish *et al.* 2007; Givnish *et al.* 2011).

Bromeliaceae apresenta distribuição essencialmente neotropical, com exceção da espécie *Pitcairnia feliciana* (A.Chev.) Harms & Mildbr., que ocorre no litoral leste do continente africano (Smith & Downs 1974; Jaques-Felix 2000; Benzing 2000; Givnish *et al.* 2007). Ecologicamente, ao longo da evolução, as Bromeliaceae desenvolveram adaptações aos mais diferentes tipos de ambientes, sendo encontradas em uma grande variedade de habitats, ocupados por um conjunto de espécies terrestres, rupícolas e epífitas (Smith & Till 1998; Benzing 2000).

O Brasil, considerado como um *hotspot* da biodiversidade, com um forte potencial endêmico, abriga cerca de 1390 espécies de bromélias (Forzza *et al.*, 2015). Do total de espécies

registradas no país, cerca de 86% são de ocorrência restrita. Bromeliaceae encontra-se amplamente distribuída em todos os domínios brasileiros, com destaque para a Floresta Atlântica (939 sp.), Cerrado (253 sp.) e Amazônia (157 sp.), por apresentarem um maior número de táxons. Além disso, as regiões Sudeste e Nordeste são as que exibem a maior diversidade de bromélias no país, com 778 e 429 espécies, respectivamente (Forzza *et al.*, 2015).

Em geral, Bromeliaceae é caracterizada por plantas herbáceas, rizomatosas, com caules reduzidos e encobertos por bainhas foliares, apresentam folhas simples, alternas, organizadas em espiral e revestidas por tricomas especializados, e na maioria dos casos, com inflorescência simples ou composta na porção central da roseta foliar, geralmente vistosas pela presença de brácteas coloridas. As flores são sésseis ou pediceladas, actinomorfas ou levemente zigomorfas, os frutos podem ser cápsulas ou bagas, com sementes aladas, plumosas ou desprovida de apêndices (Smith & Downs 1974, 1977, 1979; Proença & Sajo 2008; Cruz *et al.* 2017).

Considerado como um dos grupos taxonômicos mais relevantes, por apresentar um alto grau de endemismo e expressivo valor ecológico (Martinelli *et al.* 2008), estas plantas estão diretamente relacionadas com a complexidade estrutural do ambiente e com a sustentação da biodiversidade (Benzing 2000; Da-Rocha *et al.* 2016; Laviski *et al.* 2021). Leme & Siqueira-Filho (2007), destacam que a família é constituída predominantemente por ervas com fitotelmos, formado por um espiral de rosetas foliares que gera um micro-habitat, responsável por favorecer as interações interespecíficas. Os mesmos autores ainda enfatizam que uma grande variedade de polinizadores, consumidores de frutas e dispersores de sementes dependem das bromélias.

Do ponto de vista econômico, este grupo de plantas destaca-se por seu valor ornamental, sendo muito cultivado em vasos e utilizado em decorações de projetos paisagísticos (Rodrigues *et al.* 2007). Outras espécies são fortemente usadas pela indústria alimentícia e farmacêutica, como é o caso do *Ananas comosus* (L.) Merril (Manetti & Delaporte 2009; Ali *et al.* 2020; García *et al.* 2021; Kumar *et al.* 2023). Além disso, muitas Bromeliaceae são potencialmente citadas em estudos etnobotânicos, reafirmando a importância sociocultural da família (Nascimento *et al.* 2012; Tribess *et al.* 2015; Pedrollo *et al.* 2016; Ribeiro *et al.* 2017).

Apesar de serem consideradas primordiais para a manutenção da biodiversidade, além da importância econômica e cultural, as Bromeliaceae têm sido drasticamente reduzidas ou mesmo erradicadas em vários ecossistemas, em razão da destruição de habitats e do extrativismo seletivo (Rocha *et al.* 2004). De acordo com Martinelli & Moraes (2013),

Bromeliaceae é a segunda família de plantas com o maior número de táxons ameaçados de extinção no Brasil, sendo a primeira com mais espécies na categoria criticamente em perigo (CR).

Diante disso, são necessários reforços em estudos taxonômicos, biogeográficos e de delimitação de espécies, já que foi indicada a presença de inúmeros complexos de espécies dentro da família, podendo destacar o complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm., apontado por Ferreira & Louzada (2020). Além disso, embora tenha ocorrido avanços significativos acerca do entendimento das relações evolutivas em Bromeliaceae, ainda existem inúmeras questões sobre a delimitação de táxons problemáticos e descrições conflitantes dentro da família (Givnish *et al.* 2011; Maciel 2020).

2.2. O GÊNERO *Cryptanthus*

O gênero *Cryptanthus* Otto & A.Dietr está classificado dentro de Bromelioideae, a subfamília mais diversa de Bromeliaceae, situada no clado ‘Eu-Bromelioids’. *Cryptanthus* é considerado como um gênero derivado em Bromelioideae por apresentar tendência a andromonoiccia (flores perfeitas e estaminadas em uma mesma planta) e número cromossômico característico ($x=17$), diferindo-se do restante da subfamília ($x=25$) (Ramírez-Morillo 1996; Gitaí *et al.* 2014).

Em uma análise de caráter ancestral realizada Cruz *et al.* (2017), é possível observar a importância das flores andromonóicas na diversificação do gênero, especificamente ligado a colonização da Floresta Atlântica, onde o grupo pode ter se beneficiado de algumas vantagens, como a realocação de recurso e maior eficiência em atrair polinizadores por apresentar uma efetiva produção de pólen.

Considerado como um dos maiores gêneros de Bromelioideae, *Cryptanthus* tem distribuição geográfica estreita, ocorrendo exclusivamente na costa leste do Brasil (Nordeste e Sudeste). O gênero é composto por 68 espécies com ocorrência confirmada em uma grande variedade de habitats, como o domínio fitogeográfico Caatinga, Cerrado, e com centro de diversidade na Floresta Atlântica, onde agrupa 50 espécies endêmicas (Gouda *et al.* cont. updated; Forzza *et al.* 2015; Cruz *et al.* 2017; Maciel 2020). As plantas deste gênero são encontradas geralmente em bosques e sub-bosques, apresentando um maior número de espécies entre a Bahia (24 spp.), Espírito Santo (23 spp.), Alagoas (7 spp.) e Pernambuco (7 spp.), distribuídas do nível do mar até 2.000 m de altitude (Ramírez-Morillo 1996; Ramirez-Morillo & Brown 2001; Maciel 2020).

Cryptanthus (do grego “*cryptos*” = oculto e “*anthos*” = flor) refere-se às plantas com inflorescência nidular e flores com pedicelo curto, deixando-as não muito visíveis por estarem inseridas no centro da roseta foliar (Ramírez-Morillo 1996). Estudos mais recentes ressaltam que os representantes do gênero são ervas terrícolas, com folhas eretas, patentes ou prostradas, com lâmina foliar coriácea e margens retas ou onduladas, formando uma roseta foliar sem fitotelmo (Siqueira-Filho & Machado 2008; Alves & Marcucci 2015; Maciel 2020). Com sistema radicular bem desenvolvido, onde a reprodução assexuada ocorre facilmente através da formação de estolões, brotos basais ou axiais. Apresentam inflorescência composta, séssil, com ovário ínfero, estigma ereto, flores sem odor e frutos do tipo baga. (Ramírez-Morillo 1996; Maciel 2020). De acordo com Ramírez-Morillo (1996), morfológicamente, o gênero possui numerosas autapomorfias, incluindo flores andromonóicas, com estigma de ereção simples e ausência de vistosas brácteas florais coloridas.

Levando em consideração as características morfológicas, ecológicas e biogeográficas, Mez (1896) propôs a divisão de *Cryptanthus* em dois subgêneros, *Cryptanthus* Mez e *Hoplocryptanthus* Mez, aceito por Smith & Downs (1979) e Ramírez-Morillo (1996). Em uma análise filogenética, Cruz *et al.* (2017) apontaram o não monofiletismo de *Cryptanthus* subg. *Hoplocryptanthus*, apresentando inúmeros caracteres homoplásicos. Posteriormente, Leme *et al.* (2017) propuseram uma nova circunscrição do gênero, onde espécies do subgênero *Hoplocryptanthus* não fazem mais parte do gênero *Cryptanthus*, passando a ser incluídas em três novos gêneros (*Hoplocryptanthus* (Mez) Leme, S. Heller, *Rokautskyia* Leme, S. Heller & Zizka e *Forzzaea* Leme).

Conforme discutido por Silva & Andrade (2005), a drástica redução em áreas de Floresta Atlântica impacta diretamente no número de espécies ameaçadas de extinção. Em *Cryptanthus*, esse cenário é ainda mais preocupante, visto que de acordo com Cruz *et al.* (2017), o gênero possui em torno de 25 espécies em diferentes categorias das listas de extinção, fora aquelas que ainda não foram avaliadas devido ao conhecimento incipiente sobre o gênero. Além disso, a Floresta Atlântica é considerada como centro de especiação e diversificação *Cryptanthus*, onde cerca de 87% das espécies do gênero são endêmicas deste domínio, que está historicamente sujeito a forte exploração econômica (Martinelli *et al.* 2008). Diante da crescente ameaça à biodiversidade, surge a necessidade da rápida ampliação em estudos que busquem solucionar problemas taxonômicos existentes no gênero, a fim contribuir no delineamento de futuras estratégias sobre a conservação dessas espécies.

2.3.O COMPLEXO *Cryptanthus pickelii*

Complexos de espécies são grupos onde os limites entre as espécies não são claros e, portanto, o número de espécies é incerto. Em muitos casos, os limites morfológicos observados podem não corresponder a linhagens naturais (Mallet 1995; Grube & Kroken 2000). Esse fator é gerado pela sobreposição de caracteres morfológicos entre as espécies, que dificulta a taxonomia e torna as classificações artificiais e com posicionamento duvidoso. De forma geral, esses complexos podem ser resultados de vários eventos, como a especiação recente, convergência evolutiva ou paralelismo, diretamente ligados ao baixo número amostral associado a distribuição geográfica do táxon (Grube & Kroken 2000; Prata *et al.* 2018; Pinheiro *et al.* 2018).

Em *Cryptanthus* a delimitação de espécies é frequentemente problemática, devido, principalmente, às espécies mal tipificadas, a variação dos caracteres morfológicos, e ao histórico de hibridação natural, tornando a separação entre espécie bastante confusa (Cruz *et al.* 2017). Atualmente, há três espécies neste gênero que não possuem delimitação taxonômica bem definida e constituem o complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (Ferreira & Louzada 2020).

Descrita por Smith (1955), *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. é uma espécie de planta terrestre endêmica da Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro, com ocorrência confirmada em Pernambuco (Forzza *et al.* 2015). Devido a distribuição geográfica restrita e ao baixo tamanho populacional da espécie, Leme & Siqueira-Filho (2007), sugeriram incluir este táxon na categoria “em perigo”, entretanto, *C. pickelii* ainda não foi avaliada quanto ao seu *status* de conservação pelas listas de espécies ameaçadas de extinção (Forzza *et al.* 2015; IUCN 2019).

Já *Cryptanthus alagoanus* Leme & J.A. Siqueira, descrita por Leme & Siqueira-Filho (2001), apresenta uma distribuição mais ampla, sendo encontrada na Floresta Atlântica de Alagoas, Paraíba e Pernambuco. A espécie ainda não foi avaliada quanto à ameaça pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (Forzza *et al.* 2015).

Ferreira & Louzada (2022) descreveram a população encontrada no município de Pirambu, em Sergipe, como uma nova espécie (*Cryptanthus pirambuensis* D.M.C. Ferreira & Louzada), anteriormente descrita por Leme & Siqueira-Filho (2007) como *C. alagoanus*. Considerando a distribuição geográfica restrita de *C. pirambuensis*, com somente duas populações reconhecidas, os autores sugerem classificá-la como criticamente em perigo (CR) com base nos critérios da União Internacional para Conservação da Natureza - IUCN (2019).

Leme & Siqueira-Filho (2001; 2007), haviam descrito que *Cryptanthus alagoanus* está um tanto relacionada com *C. pickellii*. Para esses autores, *C. alagoanus* distingue-se de *C. pickellii* por apresentar estolões longos e delgados (vs. propagação por brotos axilares), com lâminas foliares mais largas (3,2-5 cm vs. 2-4 cm) e mais longas (50-60 cm vs. 25-50 cm), e com os lóbulos da sépala mais longos e mais largos (9 x 5 mm vs. 7 x 3,5 mm).

Ferreira & Louzada (2022), diferem *Cryptanthus pirambuensis* de *C. alagoanus*, principalmente, pelo número de flores na porção central da inflorescência (17-23 vs. ca. 8), número de flores na porção lateral da inflorescência (9-10 vs. 5-6) e lóbulos da sépala estreitamente elípticos (vs. lanceolada ou ovada). Além disso, para esses autores, *C. pirambuensis* difere-se de *C. pickellii* pelo número de flores na porção central da inflorescência (17-23 vs. ca. 5-11) e número de flores na porção lateral da inflorescência (9-10 vs. 3-6).

Apesar das pequenas variações descritas, o reconhecimento de *Cryptanthus pickellii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* como três espécies distintas é frequentemente problemático, apresentando muitos caracteres morfológicos que se sobrepõem, como, lâmina foliar de base estreitada, estrias transversais ausentes, com face abaxial não nervado, ápice flexível e margens onduladas. Com inflorescência sésil. As brácteas primárias de ambas as espécies são verdes, com sépalas agudas, pétalas alvas, com margens imbricadas, anteras sagitadas, tubo epígino presente, e flores não aromáticas (Smith 1955; Leme & Siqueira-Filho 2001, 2007; Forzza 2015). Além de apresentar sobreposição quanto ao comprimento (21,8 – 70,1 cm) e largura (0,9 – 5 cm) das folhas (Leme & Siqueira-Filho 2001; 2007; Ferreira & Louzada 2022)

É importante ressaltar, que de acordo com Leme & Siqueira-Filho (2007), *Cryptanthus pickellii* cresce nas planícies da Floresta Atlântica, em áreas úmidas e sombreadas, às vezes até em solos permanentemente alagados, o que pode contribuir para que o hábito caulescente e reprodução por brotos alongados seja uma adaptação ao ambiente. Já que os rizomas subterrâneos e estolões encontrados em *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* apodreceriam em contato com a alta umidade.

Visto que na maioria dos casos, os caracteres utilizados para diferenciar *Cryptanthus pickellii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* se sobrepõem, Ferreira & Louzada (2020) indicaram que as espécies não possuem limites bem definidos, agrupando-as assim, em um complexo de espécies denominado de *Cryptanthus pickellii*. Diante da dificuldade na delimitação taxonômica do complexo supracitado, tornam-se necessários estudos de caráter morfométrico e molecular para definir os limites que existem entre as espécies com maior precisão.

2.4. TAXONOMIA INTEGRATIVA NA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

A diversidade biológica pode ser observada do ponto de vista fenotípico e genotípico, levando em consideração os critérios de distribuição geográfica e as condições ambientais encontradas por cada espécie ou grupo populacional. Em um sentido mais amplo, a biodiversidade é definida como uma variedade de formas de vida existentes no planeta, associado aos papéis ecológicos que desempenha e a diversidade genética que contém (Ehrlich 1998; Wilson 1997; Odum & Barret 2007; De-Queiroz 2007; Medeiros & Albuquerque 2015; Hausdorf & Hennig 2010).

A necessidade de conservar e preservar integralmente a diversidade biológica em nível global, se tornou, nos últimos anos, um dos principais alvos das pesquisas científicas. Ainda nesse contexto, o primeiro passo para promover a conservação e manejo de uma espécie é resolver suas incertezas taxonômicas. No entanto, em alguns casos, a delimitação de espécies necessita de uma série de estudos que contribuam para a obtenção de dados mais congruentes acerca dos limites existentes entre os táxons (Frankham *et al.* 2004).

Sabendo que espécies são unidades biológicas fundamentais (Hausdorf & Henning 2010), e consideradas como hipóteses científicas (Pante *et al.* 2015), a sua delimitação é um importante ponto dentro da taxonomia integrativa, podendo ser complexa, devido ao conhecimento taxonômico ser resumido, na maioria dos casos, às variações macromorfológicas e informações limitadas sobre sua distribuição geográfica (Frankham *et al.* 2004).

Além disso, variações em caracteres vegetativos em diferentes habitats levam a morfologia sobreposta e complicam o entendimento dos taxonomistas, fazendo com que uma única espécie seja descrita várias vezes com muitos sinônimos ou impossibilitando a descoberta de novos táxons (Büger *et al.* 2016). Diante disso, um dos principais temas abordados pela taxonomia integrativa é resolução de incerteza taxonômicas, utilizando-se de múltiplas fontes de dados que surgiram ao longo dos avanços científicos e tecnológicos para delimitar e reduzir a subjetividade que existem entre as espécies com maior precisão (Wiens 2007; Fujita *et al.* 2012; Büger *et al.*, 2016).

Dessa forma, De-Queiroz (2007), propôs um conceito integrado de espécie, levando em consideração o isolamento reprodutivo, os caracteres morfológicos, ecológico e biogeográficos para sua delimitação, onde estudos morfométricos e moleculares merecem destaque (Wiens 2007; Fujita *et al.* 2012; Büger *et al.* 2016). Visto que os avanços na metodologia de obtenção das variáveis morfológicas para estudos morfométricos apontaram bons resultados (Bueno-Silva 2012; Büger *et al.* 2016; Belo *et al.* 2023), principalmente quando associados a análises moleculares (Martínez-Domínguez *et al.* 2022; Azizi *et al.* 2023).

2.4.1. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS

Desde muito tempo, o reconhecimento de espécies vegetais tem sido baseado em caracteres morfológicos (Duminil & Di-Michele 2009). No entanto, a variação fenotípica, ligada a critérios ambientais, contribui para uma variedade de formas, número e tamanho de estruturas vegetativas e reprodutivas em muitas espécies de plantas (Temponi *et al.* 2005). Esta variabilidade morfológica associada à carência em estudos taxonômicos de determinados grupos, contribui para a descrição duvidosa dos táxons, podendo influenciar no número real de espécies em determinados tratamentos taxonômicos, influenciado pela sobreposição de caracteres diagnósticos, resultando em identificações artificiais e imprecisas (Temponi *et al.* 2005; Henderson 2006).

Diante dessa problemática, os avanços na metodologia de obtenção das variáveis morfológicas através de estudos morfométricos, fortemente amparados por análises estatísticas, apontaram bons resultados (Jensen *et al.* 2002). Nos últimos anos houve um aumento considerável em estudos desse tipo, abordados a partir de diferentes perspectivas (Neffa 2010; Büger *et al.* 2016; Wahlsteen 2019; Martínez-Domínguez *et al.* 2022; Murphy *et al.* 2022; Belo *et al.* 2023; Christ *et al.* 2023). Onde, através de análises multivariadas, a morfometria fornece uma maior precisão para a delimitação de espécies morfológicamente próximas e que possuem poucos caracteres diagnósticos (Pinheiro & Barros 2007).

Dessa forma, a morfometria pode ser definida como a análise quantitativa das formas biológicas, onde na maioria dos casos, os métodos utilizados nesses estudos resolveram problemas que se mostravam intratáveis quando se utilizava somente os métodos da taxonomia tradicional (Henderson 2006). Especificamente, a morfometria linear é baseada em um conjunto de análises estatísticas utilizadas em medidas de distâncias lineares (como comprimento, largura e razão) calculadas a partir de estruturas ou partes de organismos, buscando avaliar a variação morfológica entre as populações analisadas (Rohlf & Marcus 1993; Pinheiro & Barros 2007). Devido à complexidade taxonômica de alguns grupos, essa técnica vem sendo amplamente utilizada na delimitação de espécies, como é o caso dos estudos de Gage & Wilkin (2008); Büger *et al.* (2016); Neffa (2010); Wahlsteen (2019); Martínez-Domínguez *et al.* (2022), onde é possível diferenciar, até mesmo espécies crípticas, com alto grau de confiança (Dujardin 2008).

Apesar de sua eficiência na delimitação de táxons, ainda não foram publicados estudos que abordem análises morfométricas dentro de *Cryptanthus*, mesmo diante de inúmeras contradições e imprecisões taxonômicas, diretamente associadas aos frágeis caracteres

diagnósticos, resultando em diferentes complexos de espécies dentro do gênero, como o apontado por Ferreira & Louzada (2020).

2.4.2. ESTUDOS MOLECULARES

Para Bueno-Silva (2012), o uso integrado de dados genéticos e morfológicos fornecem subsídios mais consistentes na delimitação de espécies, visto que existe uma ligação direta entre genótipo, fenótipo e caracteres ambientais. Esses fatores impulsionaram o desenvolvimento dos marcadores moleculares em estudos de genética de populações, sendo responsáveis por detectar e explorar os polimorfismos do DNA que surgem como resultado de mutações (Zolete *et al.* 2017).

A genética de populações é uma das abordagens mais indicadas diante da necessidade em compreender, delimitar e fornecer rigor às hipóteses científicas sobre as espécies (Rieseberg & Willis 2007; Padial *et al.* 2010). Essa abordagem fornece informações sobre os tipos de mudanças genéticas acerca de barreiras reprodutivas e forças evolutivas responsáveis por sua origem (Rieseberg & Willis 2007).

De acordo com Hartl (2008), os avanços dos métodos moleculares no estudo exploratório do polimorfismo genético permitiu que populações sejam estudadas independentemente da espécie ou do habitat, sem necessidade de cruzamentos controlados, genes mutantes ou quaisquer estudos anteriores. Em um sentido mais amplo, a genética de populações busca entender as causas das diferenças genéticas existentes dentro (polimorfismo) e entre espécies (divergência genética), onde técnicas moleculares favorecem na identificação dessas diferenças, contribuindo para que hipóteses evolutivas sejam testadas (Hartl 2008).

Existem diversas classes de marcadores moleculares, que se distinguem em seus princípios e metodologias. As técnicas moleculares podem ser desenvolvidas por marcadores dominantes (AFLP, PCR-RFLP e RAPD) ou codominantes (marcadores microssatélites SSR - *single sequence repetitions*) que permitem diferenciar indivíduos homozigotos e heterozigotos (Hausdorf & Hennig 2010). Os microssatélites (SSRs) são geralmente utilizados na genética vegetal, principalmente em estudos de populações naturais, por serem tipicamente codominantes, multialélicos, altamente polimórficos, uniformemente dispersos e abundantes no genoma, além de serem analisados de forma eficiente por ensaios de *Polymerase Chain Reaction* - PCR (Brondani *et al.* 1998).

Os SSRs são pequenas sequências de DNA, constituídas de unidades repetidas de nucleotídeos em tandem, encontrados em todos os genomas de eucariotos e procariotos, geralmente muito polimórfico devido ao alto nível de variação no número de repetições (Zane *et al.* 2002). São divididos de acordo com localização no genoma, como é o caso dos microssatélites nucleares (nuSSR), que foram utilizados neste trabalho, por apresentar codominância, abundância, cobertura extensiva nos genomas e alto nível de polimorfismo (Salles *et al.* 2003; Kalia *et al.* 2011).

Os locos de SSRs precisam ser desenvolvidos para cada espécie (espécie-específico). No entanto, a presença de regiões flaqueadoras conservadas contribui para a amplificação desses locos em espécies próximas (Zanella *et al.* 2011). Tendo sucesso, principalmente, em táxons com tempo de divergência recente e baixa estruturação genética, como é o caso da família Bromeliaceae, evidenciado pelos trabalhos de Boneh *et al.* (2003), Barbará *et al.* (2007), Palma-Silva *et al.* (2007), Paggi *et al.* (2008), Zanella *et al.* (2011), Goetze *et al.* (2013), Aoki-Gonçalves *et al.* (2014), Ferreira *et al.* (2017) e Chaves *et al.* (2018).

A descoberta dos microssatélites aliado ao desenvolvimento das análises estatísticas contribuiu na aplicação dessa prática em inúmeros estudos de delimitação de espécies, podendo destacar os trabalhos de Ferreira *et al.* 2017 e Ferreira *et al.* (2020), por terem sido desenvolvidos dentro de *Cryptanthus*. Esses trabalhos descreveram que os SSRs são eficientes em demonstrar o nível de diversidade e estrutura genética influenciada por diferentes pressões evolutivas. Onde, de acordo com Sales *et al.* (2001), analisar e classificar a diversidade genética nas populações naturais contribui no entendimento dos processos evolutivos que ocorreram ao longo do tempo de vida de cada táxon, fornecendo informações importantes sobre ecologia, biologia evolutiva e conservação das espécies.

3. OBJETIVOS

O presente estudo visa contribuir para o conhecimento taxonômico e evolutivo da família Bromeliaceae no Brasil, através de estudos de delimitação de espécies entre três táxons pertencentes ao complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (*Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*), por meio de dados genéticos e morfológicos. Especificamente, propõe-se:

1. Analisar e caracterizar a diversidade e estrutura genética entre e dentro das populações de *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*;
2. Investigar a variação morfológica entre populações de *C. pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*;
3. Rever a atual delimitação entre *C. pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*.

4. REFERÊNCIAS

- Alves M, Marcucci R. 2015. Nomenclatural correction in *Cryptanthus* Otto & A. Dietrich. (Bromeliaceae-Bromelioideae). *Rodriguésia*, v. 66, p. 661-664.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG IV). 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, n. 1, p. 1-20.
- Ali MM, Hashim N, Aziz SA, Lasekan O. Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. 2020. *Food Research International*, v. 137, p. 109675.
- Azizi H, Sheidai M, Mozaffarian V, Noormohammadi Z. Molecular (ISSR, cp DNA, ITS) and morphological study of the genus *Tragopogon* L.(Asteraceae). 2023. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 70, n. 2, p. 505-524.
- Aoki-Gonçalves F, Louzada RB, Souza LM, Palma-Silva C. Microsatellite loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to Neotropical rock outcrops. *Applications in plant sciences*, v. 2, n. 3, p. 1300073, 2014.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology*, v. 16, n. 10, p. 1981-1992.
- Benzing, DH. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press.
- Belo DP, Buril MT, Arruda E, Louzada RB. Disentangling the identity of two *Jacquemontia* Choisy (Convolvulaceae Juss.) species using an integrative approach. 2023. *Brazilian Journal of Botany*, v. 46, n. 1, p. 85-101.
- Brondani, RPV, Brodani C, Tarchini R, Grattapaglia D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 97, n. 5-6, p. 816-827.
- Bueno-Silva, M. 2012. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. *Estudos de Biologia*, v. 34, n. 83.
- Bünger MO, Einsehl P, Figueiredo MLN, Stehmann JR. 2016. Resolving species delimitations in the *Eugenia involucreata* Group (*Eugenia* sect. *Phyllocalyx*-Myrtaceae) with morphometric analysis. *Systematic Botany*, v. 40, n. 4, p. 995-1002.

- Cruz GAS, Zizka G, Silvestro D, Leme EMC, Schulte K, Benko-Iseppon.. Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). 2017. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 107, p. 152-165.
- Chirist AL, Saraiva DD, Nakajima JN, Ritter MR. Morphometric studies suggest taxonomic changes in a species complex in *Chromolaena* (Asteraceae, Eupatorieae, Praxelinae). *Acta Botanica Brasilica*, v. 37, 2022.
- Da-Rocha WD, Neves FS, Dáttilo W, Delabie JHCL. Epiphytic bromeliads as key components for maintenance of ant diversity and ant–bromeliad interactions in agroforestry system canopies .2016. *Forest Ecology and Management*, v. 372, p. 128-136.
- De-Queiroz K. (2007) Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* 56:879–886
- Dieringer D, Schlötterer C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. 2003. *Molecular ecology notes*, v. 3, n. 1, p. 167-169.
- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. 2008. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 8, n. 6, p. 875-890.
- Duminil J, Di-Michele M. Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. 2009. *Plant Biosystems*, v. 143, n. 3, p. 528-542.
- Ehrlich PR. 1988. The loss of diversity – causes and consequences. In: WILSON EO (Ed.). *Biodiversity*. Washington: National Academy Press, p. 21-27.
- Ferreira DMC, Louzada RB. 2020. A New Species of *Cryptanthus* (Bromeliaceae, Bromelioideae) in the Brazilian Atlantic Forest north of the São Francisco River, and its Contribution to the Taxonomy of the Genus. *Systematic Botany*, v. 45, n. 3, p. 460-465.
- Ferreira DMC, Louzada RB. 2022. Two new species of *Cryptanthus* (Bromelioideae, Bromeliaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil. *Phytotaxa*, v. 571, n. 1, p. 65-75.
- Ferreira DMC, Neri J, Palma-Silva C, Pinangé DS, Benko-Iseppon AM, Louzada RB. 2017. Cross-amplification of nuclear microsatellite markers two species of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Botany*, v. 40, n. 2, p. 475-480.
- Ferreira DMC, Palma-Silva C, Néri J, Medeiros MCMP, Pinangé DS, Benko-issepom AM, Louzada RB (2021). 2021. Population genetic structure and species delimitation in the

- Cryptanthus zonatus* complex (Bromeliaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, v. 196, n. 1, p. 123-140.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1995. Introdução ao uso de marcadores em análises genéticas. Brasília: Embrapa-Cenargen.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira-Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L. Bromeliaceae. 2015. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, McGuire JA, Moritz C. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. Trends in ecology & evolution, v. 27, n. 9, p. 480-488.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. A primer of conservation genetics. 2004. Cambridge: University Press. 220 p.
- Tribess B, Pintarelli GM, Bini LA, Camargo A, Gasper AL, Zeni ALB. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. 2015. Journal of Ethnopharmacology, v. 164, p. 136-146.
- Gage E, Wilkin P. 2008. A morphometric study of species delimitation in *Sternbergia lutea* (Alliaceae, Amaryllidoideae) and its allies *S. sicula* and *S. greuteriana*. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 158, n. 3, p. 460-469.
- García AV, Martínez MID, Landete MP, Moya MSP, Sanahuba AB. Potential of industrial pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) by-products as aromatic and antioxidant sources. 2021. Antioxidants, v. 10, n. 11, p. 1767.
- Gitaí J, Paule J, Zizka G, Schulte K, Benko-Iseppon AM. 2014. 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.
- Givnish T J, Millam KC, Berry PE, Sytsma KJ. 2007. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. Aliso 23: 3-26.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Riina BVER, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith AC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011. 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.
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM (2013). 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.
- Gouda EJ, Butcher D. A list of accepted Bromeliaceae names. [<http://bromeliad.nl/bromNames/>]. Jardim Botânico Universitário, Utrecht
- Grube M, Kroken, S. 2000. Molecular approaches and the concept of species and species complexes in *Lichenized fungi*. *Mycological Research* 104: 1284-1294.
- Hartl DL. Princípios de genética de populações. 2008. 3. Ed. – Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora.
- Hausdorf B, Hennig C. 2010. Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Systematic Biology*, v. 59, n. 5, p. 491-503.
- Henderson A. 2006. Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 151, n. 1, p. 103-111.
- IUCN Standards and Petitions Subcommittee. 2019. Guidelines for using the IUCN red list categories and criteria. Version 14. Standards and Petitions Subcommittee. Available from: <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf> (accessed on february 1, 2023).
- Jaques-Felix H. 2000. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana* 21: 118-124.
- Jensen JR, Kristen MC, Miramontes LC. Lines, outlines and landmarks: Morphometric Analyses of leaves of *Acer rubrum*, *Acer saccharinum* (Araceae) and their hybrid. 2002. *Taxon*. 51(3):475-492.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, v. 177, n. 3, p. 309-334.
- Kumar V, Dureja H, Reja H, Garg V. Traditional Use, Phytochemistry and Pharmacology of *Ananas comosus* (L.) Merr. (Family Bromeliaceae): An Update. 2023. *Current Nutrition & Food Science*, v. 19, n. 4, p. 428-441.

- Laviski BFS, Monteiro IM, Pinho LC, Baptista RLC, Mayhé-Nunes AJ, Racca-Filho F, Nunes-Freitas AF. Bromeliad habitat regulates the richness of associated terrestrial and aquatic fauna. 2021. *Austral Ecology*, v. 46, n. 5, p. 860-87.
- Leme EMC, Heller S, Zizka G, Halbritter H. 2017. New circumscription of *Cryptanthus* and new cryptanthoid genera and subgenera (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular phylogeny. *Phytotaxa*, v. 318, n. 1, p. 1-88.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA. 2001. Studies in Bromeliaceae of Northeastern Brazil. I. Selbyana, p. 146-154.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA. 2007. Bromeliad taxonomy in Atlantic Forest fragments of Pernambuco and Alagoas. *Fragments of the Atlantic Forest of Northeast Brazil*, p. 191-378.
- Maciel, J.R. 2020. *Cryptanthus* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available from: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5991>>. (accessed on october 24, 2021).
- Mallet J. 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution* 10: 294–299.
- Manetti LM, Delaporte RH, Laverde JRA. 2009. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. *Química Nova*, v. 32, p. 1885-1897.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzales M, Leitman P, Pirantininga A, Costa AF, Forzza RC. 2008. Bromeliaceae of the brazilian Atlantic Forest: checklist, distribution and conservation. *Rodriguésia*, v. 59, p. 209-258.
- Martínez-Domínguez L, Nicolalde-Morejón F, Vergara-Silva F, Guevara R, Gernandt DS, Stevenson DW. Species delimitation in *Ceratozamia* (Zamiaceae) from Southwestern Mexico, in light of reproductive and climatic diversification. 2022. *Organisms Diversity & Evolution*, p. 1-19.
- Medeiros F, Albuquerque L. 2015 A quem pertence a biodiversidade? Um olhar acerca do marco regulatório brasileiro. *Veredas do Direito: Direito Ambiental e Desenvolvimento Sustentável*, v. 12, n. 23, p. 22-22.
- Mez C. 1896. *Monographiae phanerogamarum prodromi nunc continuatio, nunc revisio: Bromeliaceae*. Masson.

- Miranda ZJG. 2013. Flora Bromeliaceae do cerrado: a literatura e a informação de herbário.
- Murphy TH, Harris J, Dwayne-Estes L. Morphometric and Molecular Evidence Delimit Six Species in *Clematis reticulata* sl (Ranunculaceae: Clematis subg. Viorna). Systematic Botany, v. 47, n. 3, p. 667-690, 2022.
- Nascimento VT, Vasconcelos MAS, Maciel MIS, Albuquerque UPl. Famine foods of Brazil's seasonal dry forests: ethnobotanical and nutritional aspects. 2012. Economic botany, v. 66, p. 22-34.
- Neffa VG. 2010. Geographic patterns of morphological variation in *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* (Turneraceae). Plant Systematics and Evolution, v. 284, p. 231-253.
- Odum EP, Barret GW. 2007. Fundamentos de ecologia. São Paulo: Thomson Learning.
- Otto C, Dietrich A. 1836. Über eine neue Gattung aus der Familie der Bromeliaceae. Allgemeine Gartenzeitung, v. 4, p. 297-299.
- Padial JM, Miralles A, Riva I, Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. frontiers in Zoology, 7 (1), 1–14.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AC, Wendt T, Lexer C (2008). 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. Molecular Ecology Resources, v. 8, n. 5, p. 980-982.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. Molecular Ecology Notes, v. 7, n. 4, p. 654-657.
- Pante E, Puillandre N, Viricel A, Arnaoud-Haond S, Aurelle D, Castelin M, Chenuil A, Destombe C, Forcioli D, Valero M, Viard F, Samadi S. 2015. Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. Molecular Ecology, v. 24, n. 3, p. 525-544.
- Pedrollo CT, Kinupp VF, Shepard G, Heinrich M. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: ethnobotanical survey and environmental conservation. 2016. Journal of Ethnopharmacology, v. 186, p. 111-124.
- Pinheiro F, Barros F. 2007. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. Nordic Journal of Botany 25: 129-136.

- Pinheiro F, Dantas-Queiroz MV, Palma-Silva C. Plant species complexes as models to understand speciation and evolution: a review of South American studies. 2018. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 37, n. 1, p. 54-80.
- Prata EMB, Sass C, Rodrigues DP, Domingos FMCB, Specht CD, Damasco G, Ribas CC, Fine PVA, Vicentini A. 2018. Towards integrative taxonomy in neotropical botany: disentangling the *Pagamea guianensis* species complex (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 188: 213–231.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945-959.
- Proença SL, Sajo MG. 2008. Anatomy of the floral scape of Bromeliaceae. *Brazilian Journal of Botany*, v. 31, p. 399-408.
- Queiroz K. Species concepts and species delimitation. 2007. *Systematic biology*, v. 56, n. 6, p. 879-886.
- Ramírez-Morillo, IM. Systematics, phylogeny, and chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). 1996. Tese de Doutorado. University of Missouri-Saint Louis.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *science*, v. 317, n. 5840, p. 910-914.
- Ribeiro RV, Bieski IGC, Balogun SO, Martins DTO. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. 2017. *Journal of ethnopharmacology*, v. 205, p. 69-102.
- Rocha CFD, Congliatti-Carvalho L, Nunes-Freitas AF, Rocha-Pessôa TC, Dias AS, Ariani CV, Morgado LN. 2004. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. *Vidalia*, v. 2, n. 1, p. 52-68.
- Rocha LP, Bezerra JIL, Prata APN, Coffani-Nunes JV, Assunção ACR, Farias MCV. 2021. Florística, aspectos fenológicos e agrupamentos ecológicos de Bromeliaceae na Caatinga em Sergipe. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, v. 6, n. 3, p. 248-258.
- Rodrigues IMC, Ferreira FA, Grossi JAS, Barbosa JG, Paula CC, Reis MR. 2007. Weed occurrence on bromeliaceae cultivation. *Planta Daninha*, v. 25, n. 4, p. 727-733.
- Rohlf FJ, Marcus LF. 1993. A Revolution morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, v. 8, n. 4, p. 129-132.

- Salles G, Buso C, Ciampi AY, Moretzsohn MC, Amaral ZPS. 2003. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microsatélites. Boletim Técnico da EMBRAPA/EPAGRI, Brasília, DF, n.20.
- Silva AJR, Andrade LHC. 2005. Northeast Ethnobotany: links between communities and vegetation of the Coast Zone of the Mata Region in Pernambuco State, Brazil. *Acta botanica brasílica*, v. 19, p. 45-60.
- Siqueira-Filho JA, Machado IC. 2008. Flowering phenology and pollination ecology of *Cryptanthus diana* Leme: a case of floral fragrance-collecting by Euglossinae bees in Bromeliaceae. *Selbyana*, p. 226-232.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Flora Neotropica, Monograph, Part 1, Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica. Organization for Flora Neotropica, Hafner, New York, p. 1-658.
- Smith LB, Downs RJ. 1977. Flora Neotropica, Monograph, Part 2, Tillandsioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica. Organization for Flora Neotropica, Hafner, New York, p. 661-1492.
- Smith LB, Downs RJ. 1979. Flora Neotropica, Monograph, Part 3, Bromelioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica. Organization for Flora Neotropica, Hafner, New York, p. 1493-2142.
- Smith LB, Till W. 1998. Bromeliaceae. In: Plantas Floridas. Monocotyledons. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 74-99.
- Smith LB. 1955. The Bromeliaceae of Brazil. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 26: 1-290
- Temponi, LG, Garcia FCP, Sakuragui CM, Carvalho-Okano RM. 2005. Morphological diversity and life forms in araceae from the Rio Doce State Park, Minas gerais. *Rodriguésia*, v. 56, p. 03-13.
- Wahlsteen E, Tyler T. 2019. Morphometric analyses and species delimitation in *Legousia* (Campanulaceae). *Willdenowia*, v. 49, n. 1, p. 21-33.
- Wiens JJ. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic biology*, v. 56, n. 6, p. 875-878.
- Wilson EO. 1997. (Org.). Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.

- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, v. 11, n. 1, p. 1-16.
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F. 2011. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Amer J Bot* 98 (9): 1511–1519.
- Zolet ACT, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. 2007. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações.

CAPÍTULO I - A ser submetido ao periódico *Brazilian Journal of Botany*

**Transferibilidade de marcadores SSR nucleares para três espécies de
Cryptanthus Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae)**

Artigo redigido seguindo as normas do periódico *Brazilian Journal of Botany*

**Transferibilidade de marcadores SSR nucleares para três espécies de *Cryptanthus* Otto
& A. Dietr. (Bromeliaceae)**

Antônia Larissa S. Maia^{1,4}, Débora Maria C. Ferreira² & Rafael B. Louzada³

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil, antonia.lmaia@ufpe.br, <https://orcid.org/0009-0008-7448-952X>

²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, PE 50670-901, Brasil, deboracavalcantif@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2728-8561>

³Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, PE 50670-901, Brasil, rafael.louzada@ufpe.br, <https://orcid.org/0000-0002-0040-7690>

⁴**Autor para correspondência:** Antônia Larissa da Silva Maia. Telefone: +55 85988352289. E-mail: antonia.lmaia@ufpe.br

RESUMO

Dezessete locos de microssatélites nucleares, originalmente desenvolvidos para *Aechmea caudata* Lindm., *Orthophytum ophiuroides* Louzada & Wand., *Pitcairnia albiflos* Herb. e *Vriesea gigantea* (Gaud.) foram testados através de amplificação heteróloga em um complexo de espécies composto por *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm, *C. alagoanus* Leme & J.A. Siqueira e *C. pirambuensis* D.M.C. Ferreira & Louzada. Dos 17 locos testados, nove foram polimórficos, e seis foram selecionados para serem amplificados e genotipados em *C. pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*. A heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) por locus entre as populações amostradas do complexo *C. pickelii* variou de 0.038 a 1.000 e 0.191 a 0.784, respectivamente. Foram estimados demais valores de diversidade genética, como o número de alelos ($A=2$ a 5), riqueza alélica ($AR=2.000$ a 5.000) e coeficiente de endogamia ($F_{IS}=-0.945$ a 0.521). Este estudo comprovou que os locos de SSR originalmente desenvolvidos para espécies de três subfamílias de Bromeliaceae são eficientes para amplificação cruzada realizada em *C. pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*. Tais resultados contribuirão diretamente para a análise da estrutura e diversidade genética em seis populações naturais das três espécies de *Cryptanthus*, favorecendo a delimitação e conservação biológica das espécies estudadas.

Palavras-chave: Amplificação cruzada; Conservação; Diversidade genética; Microssatélites.

INTRODUÇÃO

Os marcadores microssatélites nucleares (*single sequence repetitions* - SSR) são amplamente utilizados na genética vegetal, principalmente em estudos de populações naturais, por serem tipicamente co-dominantes, multialélicos, altamente polimórficos, uniformemente dispersos e abundantes no genoma, além de serem analisados de forma eficiente por ensaios de *Polymerase Chain Reaction* - PCR, podendo descrever padrões de fluxo gênico, estrutura e diversidade genética (Brondani *et al.* 1998; Hausdorf & Hennig 2010).

A descoberta dos SSR contribuiu para inúmeros estudos de genética de populações, facilitando e assegurando a compreensão taxonômica e conservação de diversos grupos de plantas, podendo citar os trabalhos de Sarthou *et al.* (2003), González-Astorga *et al.* (2004), Bárbara *et al.* (2007), Bárbara *et al.* (2008), Zanella *et al.* (2011), Lavor *et al.* (2013) e Ferreira *et al.* (2020). Apesar disso, o desenvolvimento de *primers* específicos ainda é limitado por tempo e recurso disponível (Miranda *et al.* 2012; Chaves *et al.* 2018). De forma alternativa, os SSR podem ser transferidos entre espécies de grupos filogeneticamente relacionados (amplificação cruzada), diminuindo significativamente os custos e otimizando o tempo (Ferreira & Grattapaglia 1998).

De acordo com diversos estudos moleculares publicados nos últimos anos, principalmente para táxons com tempo de divergência recente e baixa estruturação genética, como é o caso da família Bromeliaceae, a amplificação cruzada dos SSR foi satisfatória, como mostram os trabalhos de Boneh *et al.* (2003), Palma-Silva *et al.* (2007), Paggi *et al.* (2008), Goetze *et al.* (2013), Aoki-Gonçalves *et al.* (2014), Ferreira *et al.* (2017) e Chaves *et al.* (2018).

Cryptanthus Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae) é um gênero endêmico do Brasil, e inclui 68 espécies distribuídas exclusivamente ao longo da costa leste do país, com centro de diversidade na Floresta Atlântica (Gouda *et al.* cont. updated; Maciel, 2022). Considerado como

um dos maiores gêneros de Bromelioideae, *Cryptanthus* apresenta um maior número de espécies entre Bahia (24 spp.), Espírito Santo (23 spp.), Alagoas (7 spp.) e Pernambuco (7 spp.), distribuídas do nível do mar até 2.000 m de altitude (Maciel, 2020; Ramírez-Morillo, 1996).

A delimitação de espécies em *Cryptanthus* é frequentemente problemática, devido, principalmente, às espécies mal tipificadas e a variação dos caracteres morfológicos (Cruz *et al.* 2017). *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm., *Cryptanthus alagoanus* Leme & J.A. Siqueira e *Cryptanthus pirambuensis* D.M.C. Ferreira & Louzada estão restritas à Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro. *Cryptanthus pickelii* possui ocorrência confirmada em áreas úmidas e sombreadas do estado de Pernambuco, *C. alagoanus* encontra-se restrita à Floresta Atlântica dos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, e *C. pirambuensis* é endêmica de Sergipe (Leme & Siqueira-Filho 2001; Forzza *et al.* 2015; Maciel 2020; Ferreira & Louzada 2022).

Apesar das pequenas variações morfológicas descritas por Leme & Siqueira-Filho (2001; 2007) e Ferreira & Louzada (2022), essas três espécies apresentam muitos caracteres morfológicos que se sobrepõem. Diante da dificuldade em estabelecer os limites taxonômicos de *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*, Ferreira & Louzada (2020) agrupou-as em um complexo de espécies, sugerindo que seja melhor investigado, sendo necessário estudos moleculares para definir com maior precisão os limites que existem entre as espécies.

No entanto, até o momento, não foram publicados SSR desenvolvidos especificamente para *Cryptanthus* (Ferreira *et al.* 2017). Neste trabalho, 17 marcadores microsatélites nucleares, previamente desenvolvidos para *Aechmea caudata* Lindm. (desenvolvido por Goetze *et al.* 2013), *Orthophytum ophiuroides* Louzada & Wand. (Aoki-Gonçalves *et al.* 2014), *Pitcairnia albiflos* Herb. (Paggi *et al.* 2008) e *Vriesea gigantea* (Gaud.) (Palma-Silva *et al.* 2007) foram usados em testes de amplificação cruzada em *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*. Esses dados contribuirão para a análise da estrutura e diversidade genética

em seis populações naturais do complexo estudado, favorecendo a delimitação e conservação biológica das espécies-alvo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de amostras e extração de DNA

Foram coletadas amostras de folhas jovens e livres de patógenos de 64 espécimes do complexo *Cryptanthus pickelii*, distribuídos na Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil (estados de Alagoas -AL, Pernambuco - PE e Sergipe - SE) (Figura 1). Em São Lourenço da Mata – PE (*C. pickelii*), Paripueira – AL (*C. alagoanus*) e Pirambu – SE (*C. pirambuensis*) foram coletados 20 indivíduos por população. Para abranger a distribuição do complexo, foram adicionados dois indivíduos de Mamanguape – PB (*C. alagoanus*), um de Aldeia - PE (*C. pickelii*), e um de Ipojuca - PE (*C. alagoanus*) (Tabela 1). O material coletado foi armazenado em placas de Petri com sílica gel até a etapa de extração do DNA (Ferreira & Grattapaglia 1998). A coleta das folhas foi realizada respeitando uma distância de 1 a 2 m entre indivíduos, para evitar a ocorrência de possíveis clones.

O procedimento de extração do DNA genômico foi realizado de acordo com o protocolo proposto por Ferreira & Grattapaglia (1998) com algumas modificações de Weising *et al.* (2005). Depois de extraído, o DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1%), corado com GelRed (Biotum, Hayward, California, USA) para checagem da integridade obtida em cada amostra. Um Espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop Lite* (Waltham, Massachusetts, EUA) foi utilizado para a obtenção de uma quantificação mais precisa do DNA.

Para cada população amostrada, foram coletados espécimes férteis, posteriormente secos e herborizados, conforme as técnicas propostas por Fidalgo & Bononi (1989). Um voucher por população (acesso nº ALM01, ALM02, ALM03, ALM04, ALM05 e ALM06) foi depositado no Herbário Geraldo Mariz - UFP da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os espécimes foram identificados seguindo os parâmetros descritos por Leme & Siqueira-Filho (2001; 2007) e Ferreira & Louzada (2022).

Teste de amplificação cruzada de nSSR

Foram testados em *Cryptanthus alagoanus*, *C. pickelii* e *C. pirambuensis*, através da amplificação cruzada, 17 marcadores microssatélites nucleares previamente desenvolvidos para quatro espécies pertencentes à três subfamílias de Bromeliaceae, sendo, *Aechmea caudata* (Goetze *et al.* 2013), *Orthophytum ophiuroides* (Aoki-Gonçalves *et al.* 2014), *Pitcairnia albiflos* (Paggi *et al.* 2008) e *Vriesea gigantea* (Palma-Silva *et al.* 2007) (Tabela 2).

Oito indivíduos do complexo foram selecionados para o teste inicial de amplificação cruzada (quatro de *Cryptanthus alagoanus*, dois de *C. pickelii*, e dois de *C. pirambuensis*). Para as amplificações dos locos de microssatélites por PCR, foi utilizado um volume de reação de 12 µl, contendo 5 ng de DNA *template*, 5 X GoTaq Master Mix (Promega Corporation), 5 pmol de *primer forward*, 10 pmol de *primer reverse*, e 1 pmol de *primer* universal M13, marcado com fluorocromo (FAM, VIC, NED ou PET) com 19 pares de base (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3').

A PCR foi realizada em um termociclador Veriti 96-Well (*Applied Biosystems*), usando um programa de ciclos “*touchdown*” descrito detalhadamente no trabalho de Palma-Silva *et al.* (2007). Para seis locos (Op13, Op17, Op25, Op52, Op77A e PaC05) além do programa de ciclos “*touchdown*”, também foi testado um programa de ciclos “padrão”, apresentado por Palma-Silva *et al.* (2007), com modificações na temperatura de anelamento para 56°C.

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram checados em eletroforese em gel de agarose (1%), contendo, em cada poço, 3 µl do produto da PCR, 1 µl de tampão de corrida, 2 µl de *GelRed* (Biotum, Hayward, California, USA) e 2 µl de mili-Q. A corrida foi realizada a 75 volts, por cerca de 40 minutos. Em seguida, os géis foram fotografados sobre a luz

ultravioleta (UV) de um transiluminador. Uma escada de DNA (*Ladder* RTU - 100 bp) foi usada para observar o tamanho molecular dos fragmentos amplificados, comparando com o que estava descrito na literatura. O *primer* foi considerado como amplificado, quando pelo menos uma banda de tamanho esperado foi observada.

De acordo com os resultados do teste inicial de amplificação cruzada para os oito indivíduos das seis populações, os *primers* que obtiveram sucesso na amplificação foram genotipados. A genotipagem foi realizada em sequenciador automático ABI 3500 DNA *sequencer Analyzer* (*Applied Biosystems*) com tamanho padrão 600 LIZ *GeneScan* (*Applied Biosystems*).

Após o teste inicial de amplificação cruzada para os oito indivíduos de *Cryptanthus alagoanus*, *C. pickelii* e *C. pirambuensis*, os locos polimórficos com melhor padrão de genotipagem foram selecionados para serem amplificados e genotipados em 60 indivíduos de três populações diferentes, igualmente divididos entre as populações de Paripueira – AL (*C. alagoanus*), São Lourenço da Mata – PE (*C. pickelii*) e Pirambu – SE (*C. pirambuensis*) seguindo os mesmos protocolos descritos anteriormente.

Análise de dados

A faixa de tamanho dos alelos foi determinada no *software* GeneMarker, versão 2.6.4 (*Applied Biosystems*). Para identificar a presença de alelos nulos por loco nas três espécies de *Cryptanthus* foi utilizado o *software* Micro-Checker, versão 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Dentro da diversidade genética, foram analisados parâmetros como: riqueza alélica (A_R), número de alelos (A), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}), índice de fixação (F_{ST}). Esses cálculos foram feitos no *software* MSA, versão 4.05 (Dieringer & Schlötterer, 2003). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi testado por locos e por população usando o GENEPOP, versão 3.5 (Raymond & Rousset, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 17 locos de microsatélites avaliados, 13 obtiveram sucesso na amplificação, e foram selecionados para a genotipagem (Tabela 3). Nos loci Op38, Op62, Op73 e Op92 de *Orthophytum ophiuroides* não foi possível identificar ao menos uma banda de tamanho pré-estabelecido, sendo classificados como locos de amplificação sem sucesso para *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*. Dos 13 locos amplificados, nove foram polimórficos (Op13, Op17, Op25, Op52, Op69, Op77A, Op78, PaC05 e VgC01) (Tabela 3), onde seis locos com melhor padrão de genotipagem foram selecionados para análise populacional (Op13, Op17, Op25, Op69, Op78 e VgA04) (Tabela 2).

De forma geral, a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) por locus entre as populações amostradas do complexo *C. pickelii* variou de 0.038 a 1.000 e 0.191 a 0.784, respectivamente. Foram estimados demais valores de diversidade genética, como o número de alelos ($A=2$ a 5), riqueza alélica ($AR=2.000$ a 5.000) e coeficiente de endogamia ($F_{IS}=-0.945$ a 0.521). Na população de *Cryptanthus pickelii*, o número de alelos (A) variou de dois a quatro por locus e a riqueza alélica (AR) variou de 2.000 a 3.639. A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variou de 0.150 a 1.000 e 0.191 a 0.619 por locus, respectivamente (Tabela 3). Na população de *C. alagoanus*, o número de alelos (A) variou de dois a cinco por locus e a riqueza alélica foi de 2.000 a 5.000. A heterozigosidade observada (H_o) foi de 0.333 a 1.000 e a heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0.450 a 0.784 por locus (Tabela 3). Enquanto na população de *C. pirambuensis*, o número de alelos (A) variou de dois a cinco por locus e a riqueza alélica variou de 2.000 a 5.000 (Tabela 3). A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variou de 0.038 a 0.615 e 0.388 a 0.747 por locus, respectivamente (Tabela 3). Na população de *C. pickelli*, o coeficiente de endogamia (F_{IS}) por locus variou de -0.941 a 0.511, enquanto em *C. alagoanus* foi de -0.313 a 0.358, e em *C. pirambuensis* variou de -0.945 a 0.447 (Tabela 3).

A transferibilidade e amplificação de nSSR nas três espécies de *Cryptanthus* foi considerada como moderada a alta, onde 76% dos locos testados foram amplificados. A amplificação cruzada dos nSSR originalmente desenvolvidos para quatro espécies de três subfamílias de Bromeliaceae, confirma que os *primers* podem ser transferidos entre espécies relacionadas de subfamílias distintas, corroborando os resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2017) para outras espécies de *Cryptanthus*.

Os valores estimados obtidos para número de alelos (A) e riqueza alélica (AR) por locus não apresentaram grande amplitude entre as três espécies analisadas, assemelhando-se aos resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2017). Ao comparar o número de alelos obtidos em cada locus entre as populações do complexo *Cryptanthus pickelii* e o número de alelos das espécies para as quais os locus foram originalmente desenvolvidos, foi observado que em *Cryptanthus* os locos apresentaram um número menor de alelos do que os relatados por Goetze *et al.* (2013), Aoki-Gonçalves *et al.* (2014), Paggi *et al.* (2008) e Palma-Silva *et al.* (2007).

Tais resultados contribuirão diretamente para a análise da estrutura e diversidade genética das populações naturais de *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*, fornecendo subsídios para entender a história evolutiva desse complexo de espécies, buscando entender processos evolutivos que explicam a sobreposição de muitos caracteres morfológicos. Além de poder testar a hipótese de que *C. pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*, agrupadas no complexo *Cryptanthus pickelii*, fazem parte de uma mesma espécie, onde apresentam restrição no fluxo gênico populacional, que contribui para a variação em caracteres morfológicos de acordo com as adaptações ao ambiente.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Prospecção e Gestão da Biodiversidade do Nordeste (NPGBio) da UFPE.

REFERÊNCIAS

- Aoki-Gonçalves F, Louzada RB, Souza LM, Palma-Silva C (2014). Microsatellite loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to Neotropical rock outcrops. Applications in plant sciences, v. 2, n. 3, p. 1300073. doi:10.3732/apps.1300073
- Boneh L, Kuperus P, Van Tienderen PH (2003). Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. Mol Ecol Notes 3:302–303. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00432.x
- Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D (1998). Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Theoretical and Applied Genetics, 97(5), 816-827. doi: 10.1007/s001220050961
- Bünger MO, Eisenlohr PV, Figueiredo MLN, Stehmann J (2016). species delimitations in the *Eugenia involucrata* Group (*Eugenia* sect. *Phyllocalyx*-Myrtaceae) with morphometric analysis. Systematic Botany, v. 40, n. 4, p. 995-1002. doi: 10.1600/036364415X690030
- Chaves CJN, Aoki-Gonçalves F, Leal BSS, Rossatto DR, Palma-Silva C (2018). Transferability of nuclear microsatellite markers to the atmospheric bromeliads *Tillandsia recurvata* and *T. aeranthos* (Bromeliaceae). Brazilian Journal of Botany, 41(4), 931-935. doi: 10.1007/s40415-018-0494-4
- Cruz GAS, Zizka G, Silvestro D, Leme EMC, Schulte K, Benko-Iseppon AM (2017). Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus*

- Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.107, p. 152-165. doi: 10.1016/j.ympev.2016.10.019
- Dieringer D, Schlotterer C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167–169. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00351.x
- Ferreira DMC, Louzada RB (2020). A New Species of *Cryptanthus* (Bromeliaceae, Bromelioideae) in the Brazilian Atlantic Forest north of the São Francisco River, and its Contribution to the Taxonomy of the Genus. *Systematic Botany*, v. 45, n. 3, p. 460-465. doi: 10.1600/036364420X15935294613491
- Ferreira DMC, Neri J, Palma-Silva C, Pinangé DS, Benko-Iseppon AM, Louzada RB (2017). Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in two species of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 40, n. 2, p. 475-480. doi: 10.1590/2175-7860201566229
- Ferreira DMC, Palma-Silva C, Néri J, Medeiros MCMP, Pinangé DS, Benko-issepon AM, Louzada RB (2021). Population genetic structure and species delimitation in the *Cryptanthus zonatus* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 196, n. 1, p. 123-140. doi: 10.1093/botlinnean/boaa094
- Ferreira, ME, Grattapaglia D (1998). Introdução ao uso de marcadores em análises genéticas. Brasília: Embrapa-Cenargen.
- Fidalgo, O. & Bononi, V.L.R. (1989). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Reimpressão. Instituto de Botânica, São Paulo. 62p.

- Forzza, RC, Costa A, Siqueira-Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L (2015). Bromeliaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM (2013). 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. doi: 10.1016/j.bse.2012.12.022
- Hausdorf B, Henning C (2010). Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Systematic Biology*, v. 59, n. 5, p. 491-503. doi: 10.1093/sysbio/syq039
- Kalia, RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, v. 177, n. 3, p. 309-334. 10.1007/s10681-010-0286-9
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA (2007). Bromeliad taxonomy in Atlantic Forest fragments of Pernambuco and Alagoas. *Fragments of the Atlantic Forest of Northeast Brazil*, p. 191-378.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA (2001). Studies in Bromeliaceae of Northeastern Brazil. I. *Selbyana*, p. 146-154.
- Maciel JR (2020). *Cryptanthus* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5991>. Acessado 24 Out 2022
- Miranda ZJG (2013). Flora Bromeliaceae do cerrado: a literatura e a informação de herbário.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AC, Wendt T, Lexer C (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos*

- (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, n. 5, p. 980-982. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02126.x
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbara T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2007). A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. 4, p. 654-657. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01665.x
- Ramírez-Morillo IM (1996). Systematics, phylogeny, and chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). Tese de Doutorado. University of Missouri-Saint Louis.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
- Siqueira-Filho JA, Machado, IC (2008). Flowering phenology and pollination ecology of *Cryptanthus diana* Leme: a case of floral fragrance-collecting by Euglossinae bees in Bromeliaceae. *Selbyana*, p. 226-232.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molec Ecol Notes* 4: 535-538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Weising K, Nybom H, Wollff K, Kahl G. (2005). DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. Taylor & Francis.
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdière J, Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B.

Smith (Bromeliaceae), a specific 26 saxicolous species of inselbergs in French Guiana. Mol Ecol Notes. 3: 221–223. doi: 10.1046/j.1471- 8286.2003.00404.x

González-Astorga J, Cruz-Agón A, Flores-Palacios A, Vovides AP (2004). Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). Annals of Botany 94: 545–551.

Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007). Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). Molecular Ecology, v. 16, n. 10, p. 1981-1992.

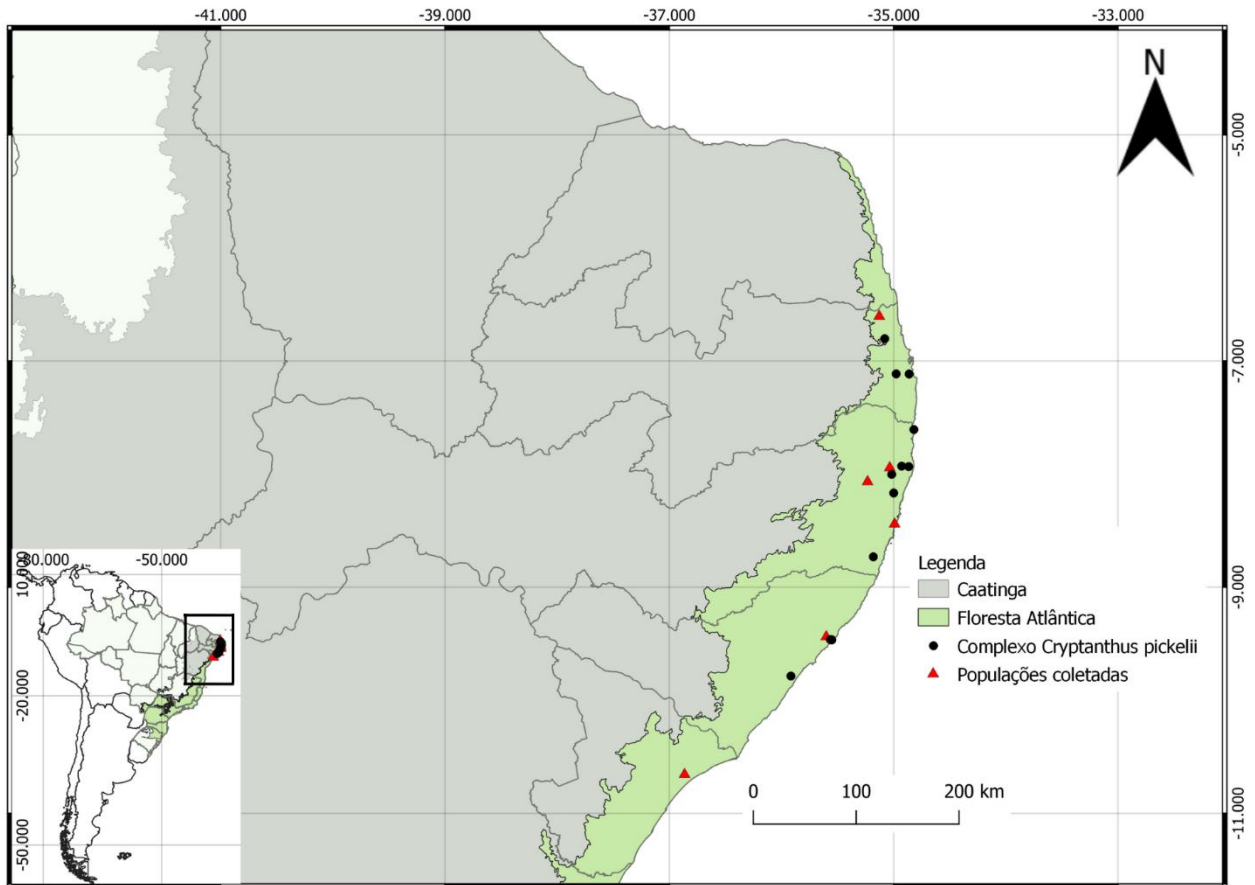
Barbará T, Lexer C, Martinelli G, Mayo S, Fay MF, Heuertz M (2008). Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). Heredity 101: 285–296. doi:10.1038/hdy.2008.65

Zanella CM , Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F (2011). Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). Amer J Bot 98 (9): 1511–1519. doi:10.3732/ajb.1000458

Lavor P, van den Berg C, Versieux LM (2013). Transferability of 10 nuclear microsatellite primers to *Vriesea minarum* (Bromeliaceae), a narrowly endemic and threatened species from Brazil. Braz J Bot 36(2): 165-168. doi: 10.1007/s40415-013-0012-7

FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica das populações amostradas no complexo de espécies *Cryptanthus pickelii* ao longo da Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro.



TABELAS

Tabela 1. Localização e coordenadas geográficas das seis populações amostradas do complexo de espécies *Cryptanthus pickelii*.

| Espécie | Estado | Município | Localidade | Latitude S | Longitude W | N |
|------------------------|---------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| <i>C. pickelii</i> | PE | São Lourenço da Mata | Reserva Ecológica Tapacurá | 08°04'00" | 35°14'00" | 20 |
| <i>C. pickelii</i> | PE | Aldeia | Mata do Torquato Castro | 07°56'38" | 35°02'09" | 1 |
| <i>C. alagoanus</i> | AL | Paripueira | RPPN Sabiá | 09°26'17" | 35°36'07" | 20 |
| <i>C. alagoanus</i> | PB | Mamanguape | Estação Ecológica do Pau Brasil | 06°36'16" | 35°07'45" | 2 |
| <i>C. alagoanus</i> | PE | Ipojuca | Mata do Cupe | 08°26'28" | 34°59'33" | 1 |
| <i>C. pirambuensis</i> | SE | Pirambu | Mata de Sambaíba | 10°39'19" | 36°51'53" | 20 |

Estados: Alagoas (AL), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Sergipe (SE). Reserva Permanente de Proteção Ambiental (RPPN). Número de indivíduos amostrados por população no teste de amplificação cruzada (N).

Tabela 2. Amplificação cruzada de 17 marcadores microssatélites nucleares originalmente desenvolvidos para três subfamílias de Bromeliaceae e testados em *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*.

| Locus | Espécie | Subfamília | Referência | Amplificaçã o | Polimórfico |
|--------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------------|------------------|-------------|
| Ac01 | <i>Aechmea caudata</i> | Bromeliodeae | Goetze <i>et al.</i> (2013). | + | -' |
| Op13*/ | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | +" |
| Op17*/ | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | +" |
| Op25*/ | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | +" |
| Op30 | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | +' |
| Op38 | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | - | - |
| Op52* | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | +' |
| Op62 | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | - | - |
| Op69/ | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | + |
| Op73 | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | - | - |
| Op77A* | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | +" |
| Op78/ | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | + |
| Op92 | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | - | - |
| Op93 | <i>Orthophytum ophiuroides</i> | Bromeliodeae | Aoki-Gonçalves <i>et al.</i> (2014). | + | - |
| PaC05* | <i>Pitcairnia albiflos</i> | Pitcairnioideae | Paggi <i>et al.</i> (2008). | + | +" |
| VgC01 | <i>Vriesea gigantea</i> | Tillandsioideae | Palma-Silva <i>et al.</i> (2007). | + | +' |
| VgA04/ | <i>Vriesea gigantea</i> | Tillandsioideae | Palma-Silva <i>et al.</i> (2007). | + | +' |

* = programa de ciclos *touchdown* e programa de ciclo padrão foram usados; + = loco amplificado/polimórfico; - = loco não amplificado/não polimórfico; ' = padrão de genotipagem não analisável; " = padrão de genotipagem não analisável com o programa de ciclos e polimórfico com o programa de ciclos padrão; /= loco selecionado para genotipagem populacional.

Tabela 3. Estimativa da diversidade genética para seis locos polimórficos de nuSSR desenvolvidos para outras espécies de Bromeliaceae e transferidos para *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*.

| Locus | Faixa de tamanho | A | AR | H _o | H _E | F _{IS} |
|---|------------------|---|-------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>Cryptanthus pickelii</i> (n= 20) | | | | | | |
| Op13 | 205-207 | 2 | 2.000 | 1.000 | 0.509 | -0.941 |
| Op17 | 167-180 | 2 | 2.000 | 0.296 | 0.257 | -0.164 |
| Op25 | 176-182 | 4 | 3.639 | 1.000 | 0.619 | -0.641 |
| Op69 | 112-126 | 3 | 2.914 | 0.150 | 0.308 | 0.521 |
| Op78 | 221-224 | 4 | 3.183 | 0.150 | 0.191 | 0.219 |
| VgA04 | 173-175 | 2 | 2.000 | 0.947 | 0.512 | -0.895 |
| <i>Cryptanthus alagoanus</i> (n= 20) | | | | | | |
| Op13 | 205-216 | 3 | 3.000 | 0.647 | 0.497 | -0.313 |
| Op17 | 167-177 | 5 | 5.000 | 1.000 | 0.784 | -0.285 |
| Op25 | 168-178 | 2 | 2.000 | 0.600 | 0.466 | -0.295 |
| Op69 | 116-124 | 2 | 2.000 | 0.333 | 0.514 | 0.358 |
| Op78 | 223-228 | 4 | 3.927 | 0.944 | 0.661 | -0.445 |
| VgA04 | 173-175 | 2 | 2.000 | 0.650 | 0.450 | -0.462 |
| <i>Cryptanthus pirambuensis</i> (n= 20) | | | | | | |
| Op13 | 210-215 | 2 | 2.000 | 0.500 | 0.388 | -0.317 |
| Op17 | 167-177 | 2 | 2.000 | 0.038 | 0.423 | -0.945 |
| Op25 | 162-190 | 4 | 4.000 | 0.615 | 0.747 | 0.183 |
| Op69 | 116-120 | 2 | 2.000 | 0.285 | 0.507 | 0.447 |
| Op78 | 220-226 | 5 | 5.000 | 0.461 | 0.513 | 0.106 |
| VgA04 | 173-175 | 2 | 2.000 | 0.357 | 0.388 | 0.085 |

Número de alelos (A), riqueza alélica (AR), heterozigosidade observada (H_o), esperada heterozigosidade (H_E), coeficiente de endogamia (F_{IS}).

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

**Delimitação de espécies e estrutura genética do complexo
Cryptanthus pickelii L.B.Sm. (Bromeliaceae)**

Artigo redigido seguindo as normas do periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Título: Delimitação de espécies e estrutura genética do complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (Bromeliaceae)

Autores: Antônia Larissa da Silva Maia^{1,4}, Débora Maria Cavalcanti Ferreira² & Rafael Batista Louzada³

Instituições:

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil, antonia.lmaia@ufpe.br

²Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil, deboracavalcantif@hotmail.com

³Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil, rafael.louzada@ufpe.br

⁴**Autor para correspondência:** Antônia Larissa da Silva Maia. Telefone: +55 85988352289.
E-mail: antonia.lmaia@ufpe.br

RESUMO

O gênero *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae – Bromelioideae) é endêmico do Brasil e compreende 68 espécies, com centro de diversidade na Floresta Atlântica. *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* não apresentam delimitação taxonômica bem definida e constituem o complexo *Cryptanthus pickelii*. Neste trabalho, foram realizadas abordagens morfométricas e moleculares para delimitar o complexo e caracterizar a estrutura e a diversidade genética de seis populações estudadas. Análises morfométricas multivariadas de 24 caracteres vegetativos e reprodutivos foram realizadas em 82 espécimes. Seis locos de microsatélites nucleares foram genotipados em 120 indivíduos do complexo. Os resultados morfométricos mostraram quatro morfotipos. A análise bayesiana revelou três grupos mais prováveis, indicando que *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* são dois nomes dados à mesma espécie. Foi detectado uma estruturação genética distinta em duas populações de *C. alagoanus*. Apresentamos o primeiro registro de *C. pickelii* para o estado da Paraíba. Também reforçamos a hipótese de especiação híbrida em uma população de *C. alagoanus* com *C. zonatus*. Foi proposto a sinonimização de *C. pirambuensis* a *C. alagoanus*, indicando áreas prioritárias para o estabelecimento de unidades de conservação, onde reavaliemos o status de conservação de *C. pickelii* para ameaçado e de *C. alagoanus* para criticamente ameaçado.

Palavras-chave: Bromeliaceae – diversidade genética – estrutura genética – Floresta Atlântica – genética de populações – marcadores moleculares – morfometria.

INTRODUÇÃO

Espécies representam unidades biológicas fundamentais (Hausdorf & Henning 2010), consideradas como hipóteses científicas (Pante *et al.*, 2015), na qual sua delimitação é um importante ponto dentro da taxonomia integrativa, podendo ser complexa, devido ao conhecimento taxonômico ser resumido, na maioria dos casos, às variações macromorfológicas e informações limitadas sobre a distribuição geográfica dos táxons (Duminil & Di-Michele 2009). Esses fatores, associados à carência em estudos taxonômicos de determinados grupos, contribui para uma descrição duvidosa das espécies (Temponi *et al.*, 2005; Büger *et al.*, 2016).

Um dos principais temas abordados pela taxonomia integrativa é resolução de incerteza taxonômicas, utilizando-se de múltiplas fontes de dados (morfologia, biogeografia, ecologia e genética) que surgiram ao longo dos avanços científicos e tecnológicos para delimitar e reduzir a subjetividade que existem entre as espécies com maior precisão (Wiens 2007; Fujita *et al.* 2012; Büger *et al.* 2016). Nos últimos anos, uso integrado de dados genéticos e morfométricos forneceram subsídios mais consistentes na delimitação de espécies, contribuindo para a resolução de incertezas taxonômicas de muitos grupos complexos, fornecendo rigor para que hipóteses científicas sobre as espécies fossem propostas e/ou testadas (Mallet 1995; Grube & Kroken 2000; Rieseberg & Willis 2007; Bueno-Silva 2012; Padial *et al.* 2010; Zolte *et al.* 2017). Como evidenciado nos trabalhos de Gage & Wilkin (2008); Büger *et al.* (2016) e Ferreira *et al.* (2020), onde é possível diferenciar, até mesmo espécies crípticas, com alto grau de confiança.

Cryptanthus Otto & A.Diettr. (Bromeliaceae – Bromelioideae) é um gênero endêmico do Brasil e compreende 68 espécies distribuídas no domínio fitogeográfico Caatinga, Cerrado e com centro de diversidade na Floresta Atlântica (Gouda *et al.* cont. updated; Forzza *et al.* 2015; Cruz *et al.* 2017; Maciel 2020). É predominantemente composto por ervas terrícolas, com folhas eretas, patentes ou prostradas, com lâmina foliar coriácea e margens retas ou onduladas,

formando uma roseta foliar sem fitotelmo (Siqueira-Filho & Machado 2008; Maciel 2020). Com flores andromonóicas, estigma de ereção simples e ausência de vistosas brácteas florais coloridas (Ramírez-Morillo 1996).

Em *Cryptanthus*, a delimitação de espécies é frequentemente problemática, devido principalmente às espécies mal tipificadas e às variações dos caracteres morfológicos, tornando a separação entre espécie bastante confusa (Cruz *et al.* 2017). Atualmente, há três espécies em *Cryptanthus* que não possuem delimitação taxonômica bem definida e constituem o complexo *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (Ferreira & Louzada 2020).

Cryptanthus pickelii L.B.Sm., descrita por Smith (1955), é endêmica da Floresta Atlântica de Pernambuco (Forzza *et al.* 2015). *C. alagoanus* Leme & J.A. Siqueira, descrita Leme & Siqueira-Filho (2001), apresenta uma distribuição mais ampla, sendo encontrada na Floresta Atlântica de Alagoas, Paraíba e Pernambuco. *C. pirambuensis* D.M.C. Ferreira & Louzada, descrita por Ferreira & Louzada (2022), encontra-se restrita à Floresta Atlântica de Sergipe, onde foi anteriormente considerada como *C. alagoanus* por Leme & Siqueira-Filho (2001). Devido a estreita distribuição geográfica e ao baixo tamanho populacional das espécies, Leme & Siqueira-Filho (2007) e Ferreira & Louzada (2022), sugeriram incluir estes táxons na categoria Criticamente em Perigo (CR) com base na União Internacional para Conservação da Natureza - IUCN (2019).

Para Leme & Siqueira-Filho (2001; 2007) *Cryptanthus alagoanus* distingue-se de *C. pickelii* por apresentar estolões longos e delgados (*vs.* propagação por brotos axilares), com lâminas foliares mais largas (3,2-5 cm *vs.* 2-4 cm) e mais longas (50-60 cm *vs.* 25-50 cm), e com os lóbulos da sépala mais longos e mais largos (9 x 5 mm *vs.* 7 x 3,5 mm). Ferreira & Louzada (2022), diferem *Cryptanthus pirambuensis* de *C. alagoanus*, principalmente, pelo número de flores na parte apical da inflorescência (17-23 *vs.* ca. 8), número de flores na parte lateral da inflorescência (9-10 *vs.* 5-6) e lóbulos da sépala estreitamente elípticos (*vs.* lanceolada

ou ovada). Além disso, para esses autores, *C. pirambuensis* difere-se de *C. pickelii* pelo número de flores na parte apical da inflorescência (17-23 vs. ca. 5-11) e número de flores de inflorescência lateral (9-10 vs. 3-6).

Apesar das pequenas variações descritas, o reconhecimento de *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* como três espécies distintas é frequentemente problemático, apresentando sobreposição nas medidas de muitos caracteres diagnósticos. Diante da dificuldade na delimitação taxonômica do complexo *Cryptanthus pickelii*, no presente estudo, usamos uma abordagem integrativa, combinando dados morfológicos e moleculares, através de marcadores microssatélites nucleares (SSR) e morfometria linear, para testar a hipótese de que *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*, agrupadas no complexo *Cryptanthus pickelii*, fazem parte de uma mesma espécie, onde apresentam restrição no fluxo gênico populacional, que contribui para a variação em caracteres morfológicos de acordo com as adaptações ao ambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES

As amostras foram coletadas de fevereiro a setembro de 2022, em seis populações naturais do complexo *Cryptanthus pickelii* (Figura 1). Para esse estudo, toda a distribuição geográfica do complexo foi incluída, abrangendo as populações da Floresta Atlântica dos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco e Sergipe, localizadas especificamente nos municípios de Paripueira - AL, Mamanguape - PB, Aldeia - PE, Ipojuca - PE, São Lourenço da Mata - PE e Pirambu - SE (Figura 2), com distância geográfica entre populações variando de 25 a 495 km (Tabela 1.)

Para extração de DNA, foram coletadas folhas jovens e livre de patógenos de 120 indivíduos pertencentes a seis populações do complexo. Foram amostrados 20 indivíduos para

cada população. Foi estabelecida uma distância de 1 a 2 metros entre indivíduos para evitar a ocorrência de possíveis clones. Assim como descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), as folhas foram armazenadas em sílica gel até a etapa de extração de DNA.

Para a análise morfométrica, foram coletados indivíduos férteis, posteriormente secos e herborizados, conforme as normas propostas por Fidalgo & Bononi (1989), e depositadas no Herbário Geraldo Mariz (UFP). As estruturas reprodutivas das plantas foram fixadas em solução de álcool 70% para realização das análises morfométricas. Para avaliar a variação morfológica do complexo, foram coletados de 10 a 20 indivíduos por população. Os espécimes foram identificados seguindo os caracteres diagnósticos descritos por Leme & Siqueira-Filho (2007) e Ferreira & Louzada (2022), evidenciados na Tabela 2.

COLETA E ANÁLISE DE DADOS MORFOMÉTRICOS

A coleta e análise de dados morfométricos foi baseada na metodologia adotada por Bünger *et al.* (2015) e Belo *et al.* (2023). As análises macromorfológicas foram realizadas em 82 indivíduos de seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*, sendo 18 indivíduos da população de Paripueira – AL, 10 de Mamanguape – PB, 11 de Aldeia – PE, 16 de Ipojuca – PE, 14 de São Lourenço da Mata – PE e 13 da população de Pirambu – SE (Figura 1; Tabela 1). Assim como Bünger *et al.* (2015), os espécimes representativos para análise multivariada foram selecionados de acordo com dois critérios principais: presença de flores e informações precisas sobre o local de coleta.

As medidas morfométricas vegetativas foram coletadas usando um paquímetro digital com resolução de 0,1 mm e exatidão de $\pm 0,3$ mm. Para as medidas de componentes reprodutivos foi utilizado um papel milimetrado em estereomicroscópio. Posteriormente, as medidas foram transformadas em centímetro (cm). A variação morfológica presente no complexo de espécie estudado foi analisada através de uma matriz de dados com 24 caracteres

vegetativos e florais, sendo eles: comprimento da folha menor (CFME), comprimento da folha maior (CFMA), largura da folha menor (LFME), largura da folha maior (LFMA), comprimento da base da folha menor (CBME), comprimento da base da folha maior (CBMA), largura da base da folha menor (LBME), largura da base da folha maior (LBMA), largura do ápice da folha menor (LAME), largura do ápice da folha maior (LAMA), comprimento da bainha da folha menor (CBFME), comprimento da bainha da folha maior (CBFMA), largura da bainha da folha menor (LBFME), largura da bainha da folha maior (LBFMA), comprimento da flor menor (CFLME), comprimento da flor maior (CFLMA), largura da flor menor (LFLME), largura da flor maior (LFLMA), comprimento da sépala menor (CSME), comprimento sépala maior (CSMA), comprimento da pétala menor (CPME), comprimento da pétala maior (CPMA), número de flores na parte apical da inflorescência (NFCA) e número de flores na parte lateral da inflorescência (NFCL). A escolha dos caracteres foi realizada com base nas descrições de Leme & Siqueira-Filho (2007) e Ferreira & Louzada (2022), usadas para diferenciar *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* (Tabela 1).

Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para classificar a matriz de dados morfológicos. Além da PCA, foi usado uma análise de agrupamento em cluster para visualização inicial sobre a similaridade das populações amostradas, usando os pacotes “factoextra” (Kassambara & Mundt 2016), “dendextend” (Galili 2015) e “igraph” (Csardi 2019).

A distribuição e normalidade dos dados foi verificada usando o teste Shapiro-Wilk, com o pacote “nortest” (Gross & Ligges 2015). Os dados morfológicos foram submetidos a análise por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando o pacote “dplyr” (Wickham *et al.* 2021). Foi utilizado o teste Wilcoxon para analisar e identificar as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os caracteres selecionados e as populações, comparando as duas variáveis pareadas. A PERMANOVA (*Permutation Multivariate Analysis of Variance*), foi usada para

comparar grupos através do método de permutação de Bray-Curtis, assumindo 9999 permutações. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R Core Team V.4.2.3 (2021).

EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM

A extração de DNA das amostras coletadas seguiu o protocolo proposto por Ferreira & Grattapaglia (1998) com algumas modificações de Weising *et al.* (2005). Após a extração, o DNA foi quantificado em um espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop Lite* (Waltham, Massachusetts, EUA). A qualidade do DNA obtida em cada amostras foi analisada em gel de agarose (1%), corado com GelRed (Biotum, Hayward, California, USA).

Seis locos de marcadores microssatélites nucleares desenvolvidos originalmente para *Orthophytum ophiuroides* Louzada & Wand. (Aoki-Gonçalves *et al.* 2014 – locos: Op13, Op17, Op25, Op69 e Op78), e *Vriesea gigantea* (Gaud.) (Palma-Silva *et al.* 2007 – lócus: VgA04) foram utilizados neste estudo. Todos os locos selecionados foram previamente analisados em *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*, através de teste de amplificação cruzada realizado por Maia *et al.* (Capítulo I).

Para as amplificações dos seis locos de microssatélites nucleares por PCR (*polymerase chain reaction*) foi utilizado um volume de reação de 12 µl, contendo 5 ng de DNA *template*, 5 X GoTaq Master Mix (Promega Corporation), 5 pmol de *primer forward*, 10 pmol de *primer reverse*. Para cada SSR, 1 pmol de *primer* universal foi sintetizado com uma cauda M13 (FAM, VIC, NED ou PET) de 19 pares de base (pb) (5'-CACGACGTTGTAAAAC-GA C-3'). A reação foi realizada usando dois programas de ciclos (“*touchdown*” e padrão) descritos detalhadamente no trabalho de Palma-Silva *et al.* (2007). Os produtos da PCR foram checados em eletroforese em gel de agarose (1%), corado com *GelRed* (Biotum, Hayward, California, USA). Os locos amplificados foram genotipados em um sequenciador automático 3500 DNA

Analyzer (Applied Biosystems) com tamanho padrão 600 LIZ *GeneScan (Applied Biosystems)*. A faixa de tamanho dos alelos em pares de base foi determinada no *software* GeneMarker V.2.6.4 (*Applied Biosystems*).

ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES

Diversidade e estrutura genética das populações

O *software* GIMLET versão 1.3.3 (Valière 2002) foi utilizado para detectar o número total de clones em cada população. As análises de diversidade genética das populações e dos locos foram realizadas pelo *software* MSA (Dieringer & Schlötterer 2003), por meio do número de alelos (A), riqueza alélica (AR), variância no tamanho dos alelos (Var), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_E). O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) foi calculado no FSTAT versão 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). O coeficiente de endogamia (F_{IT}), índice de fixação (F_{ST}) e número de alelos privados (PA) foram analisados no programa GENEALEX. O *software* GENEPOP V.4.2 (Raymond & Rousset 1995) foi utilizado para analisar os princípios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O *software* STRUCTURE V.2.3.4 (Hubisz *et al.*, 2009) foi usado para investigar a estrutura genética das populações através de uma análise bayesiana, atribuindo indivíduos a grupos genéticos (K) e estimando as proporções de mistura (Q) para cada um deles (Pritchard, Stephens & Donnelly 2000). As análises foram realizadas sob um modelo de mistura assumindo frequências alélicas correlacionadas. Foi utilizado um período de burn-in de 500.000, e número de repetições em Cadeia de Markov Monte Carlo - MCMC de 1.000.000. Foram assumidas 20 interações por K (K1 à K10), para confirmar a estabilização da estatística. Os dados provenientes dessa etapa foram usados no *software* STRUCTURE HARVESTER V.0.6.94 para determinar o número de agrupamentos mais provável (K) com base no método proposto por

Evanno *et al.* (2005). O gráfico com as proporções de mistura (Q) foi gerado no Clumpak (Kopelman *et al.* 2015).

Isolamento por distância

Para testar a hipótese de diferenciação populacional por isolamento à distância entre as populações amostradas no complexo *Cryptanthus pickelii*, foi empregado o teste de Mantel para avaliar a correlação entre duas matrizes de dados, uma com distância geográfica e uma de distância genética. A matriz de distância geográfica (km) foi criada manualmente com o auxílio do *software* QGIS v.3.26.3. O MSA foi utilizado para criar a matriz de distância genética (F_{ST}). Foi utilizado o *software* GENEPOP V.4.2 (Raymond & Rousset 1995) para calcular o valor de P para o teste de Mantel. O valor do coeficiente de correlação (r^2) foi calculado a partir dos dados gerados pelo GENEPOP.

Diferenciação genética

No *software* ARLEQUIN V.3.5 (Excoffier *et al.* 2005), através da análise de variância molecular (AMOVA), foi avaliado a distribuição da variação genética em três níveis hierárquicos: entre grupos (F_{CT}), entre subpopulações dentro de grupos (F_{SC}) e dentro de subpopulações (F_{ST}) (Excoffier & Lischer 2010). Os grupos foram definidos de acordo com os agrupamentos mais prováveis (K) gerados pelo *software* STRUCTURE HARVESTER, com base no método definido por Evanno *et al.* (2005).

Tamanho efetivo das populações e taxa de migração

Com base na metodologia adotada por Barbará *et al.* (2007), o número efetivo de migrantes (N_eM) e o valor de Theta entre as populações pareadas foram estimadas através do *software* MIGRATE v.2.0.6 (Beerli & Felsenstein, 1999). O tamanho efetivo populacional

(Ne) foi estimado utilizando a fórmula $Ne = \Theta / 4\mu$, onde μ representa a taxa de mutação. Neste estudo, o valor utilizado para a taxa de mutação foi de 10^{-3} por gameta por geração, conforme mencionado por Zhang e Hewitt (2003) e adotado por Ferreira *et al.* (2020).

Reavaliação do status de conservação

O status de conservação foi das espécies foi definido de acordos com os critérios e categorias propostos pela União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN (2019). Uma ferramenta de avaliação de conservação geoespacial – GeoCAT (Bachman *et al.*, 2011) foi utilizada para determinar a extensão de ocorrência (EOO) e área de ocupação das espécies (AOO). Os pontos de ocorrência para a análise foram das seis populações coletadas (Tabela 1), incluindo informações adicionais disponíveis no material examinado.

RESULTADOS

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CARACTERES SELECIONADOS

Todos os 24 caracteres vegetativos e reprodutivos selecionados foram informativos para a análise morfométrica, sendo utilizados para construção da PCA (Figura 3) e do agrupamento por similaridade (Figura 4). Desses, 12 caracteres merecem destaque por apresentar variação substancial em relação ao tamanho das estruturas nas populações amostradas (CFME, CFMA, CBME, CBMA, LBME, LBMA, CFLME, CFLMA, CSME, CSMA, CPME e CPMA). Esses caracteres foram importantes para identificar a descontinuidade e semelhança entre as populações (Figura 5 e 6; Tabela 3), onde a ANOVA indicou um efeito significativo ($p < 0,05$) das populações analisadas sobre os caracteres selecionados.

Os dois principais eixos da PCA sobre os 24 caracteres selecionados resumizam cerca de 55% de variação. O primeiro eixo indicou 37,1% de variância e o segundo eixo concentrou 17,8% da variação, separando as populações em quatro grupos (ALD + SLM, PIR, IPO e MAM + PAR) (Figura 3). O agrupamento por similaridade, evidenciou um dendrograma com cinco

grupos (ALD + SLM, PIR, IPO, MAM e PAR) (Figura 4). O teste de Kruskal-Wallis indicou que todos os caracteres analisados tiveram valor de p estatisticamente significativo ($<0,05$) (Tabela 4).

Essas análises exploratórias indicaram que as populações de Aldeia (ALD) e São Lourenço da Mata (SLM) têm valores relativamente sobrepostos que as agruparam. Onde, em comparação com as demais populações, apresentam medidas de comprimento e largura menores para todas as variáveis analisadas. Quanto aos caracteres vegetativos dos indivíduos das populações de ALD e SLM, a média do CFME abrangeu os intervalos de 12,68 e 14,56 cm, o CFMA foi de 32,12 e 38,99 cm, a LFME de 1,36 e 2,29 cm, o CBME de 1,96 e 2,03 cm, o CBMA de 2,11 e 2,36 cm, e a LBMA de 1,06 e 1,11 cm (Tabela 3). Além disso, foi evidenciado similaridades de ALD e SLM entre a média de comprimento dos seguintes caracteres reprodutivos: CFLME (1,85 e 1,92 cm), CFLMA (2,39 e 2,87 cm), CSME (0,51 e 0,53 cm), CSMA (0,61 e 0,63 cm), CPME (1,32 e 1,78 cm), CPMA (1,78 e 2,23 cm), NFCA (9,36 – 9,42) e NFCL (6,45 – 6,28) (Tabela 3). As medidas vegetativas e florais mostraram dependências em alguns casos. Por exemplo, as populações de ALD e SLM apresentaram tendência para folhas menores e produzem flores menores quando comparadas às demais populações.

Apesar dos indivíduos de Mamanguape (MAM) e Paripueira (PAR) apresentarem semelhanças para alguns caracteres, diferem-se quanto ao CFLME (2,90 e 3,16 cm), CFLMA (4,12 e 5,11 cm) e LBME (3,07 e 2,02 cm). Além disso, MAM compartilha algumas características morfológicas com as populações de ALD e SLM (LFME, LFMA, CBME, CBMA, LBMA, LAME, LAMA, LBFME, LBFMA, LFLME, LFLMA) (Tabela 3).

Embora apresente sobreposição quanto aos extremos das medidas analisadas, a população de Ipojuca (IPO) difere-se das demais pelo CFME (17,92 cm), CFMA (39,60 cm), LFME (3,33 cm), LFMA (3,68 cm), CFME (3,94 cm), CFMA (4,40 cm), CSME (0,89 cm),

CSMA (0,97 cm), CPME (3k,05 cm), CPMA (3,37 cm), NFCA (4,62) e NFCL (3,31), estando morfológicamente mais relacionada com MAM e PAR (Figura 2 e 3; Tabela 3).

As amostras coletadas na população de Pirambu (PIR) são morfológicamente mais semelhantes à população de PAR, no entanto, apresenta descontinuidade, principalmente, nas medidas dos caracteres reprodutivos (Figura 3 e 4). De forma geral, os indivíduos de PIR apresentaram uma média de tamanho maior para: CFLME (5,09 cm) CFLMA (5,88 cm), CSME (1,17 cm), CSMA (1,34 cm), CPME (3,92 cm), CPMA (4,57 cm) e uma quantidade maior de NFCA (10,61) e NFCL (7,46), diferindo-se dos valores encontrados nas outras populações do complexo (Tabela 3).

Os resultados do teste Wilcoxon sobre as comparações das variáveis pareadas indicou que as populações ALD e SLM não diferiram estatisticamente entre si para a maioria dos caracteres analisados, com $p > 0,05$ para CFME, CFMA, CBME, CBMA, LBME, LBMA, LAME, LAMA, LBFME, LBFMA, CFLME, LFLME, LFLMA, CSME, CSMA, NFCA e NFCL. Em geral, a população de PIR diferenciou-se estatisticamente ($p < 0,05$) de ALD, SLM, IPO, MAM e PAR, principalmente, quanto aos caracteres reprodutivos. IPO diferenciou-se estatisticamente de ALD, PAR, PIR e MAM. Para 15 dos 24 caracteres analisados (CFME, LFME, CBME, CBMA, CBFME, CBFMA, LBFME, LBFMA, CFLME, LFLME, LFLMA, CSME, CSMA, CPME e NFCA), o teste de Wilcoxon não mostrou uma diferença estatística significativa entre MAM e PAR (Tabela 5 e 6), explicando a formação inicial de quatro grupos observado na análise exploratória (Figura 3).

Não houve diferença estatística quando comparadas as populações de ALD e SLM na PERMANOVA e MANOVAs ($p > 0,05$). No entanto, quando IPO, MAM, PAR e PIR foram comparadas, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Tabela 7), corroborando em parte com os resultados das análises exploratórias realizadas (Figura 3 e 4).

DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS

Dentre os 120 indivíduos amostrados, 26 foram detectados como clones e, portanto, foram excluídos das análises populacionais (Tabela 8). A riqueza alélica (AR) das populações do complexo *Cryptanthus pickelii* apresentou variação de 2,293 a 2,863, com média de 2,822. A variância no tamanho do alelo (Var) foi de 1,660 a 20,225, com média de 15,524. As populações de ALD e MAM foram as únicas que não apresentaram alelos privados (Tabela 8). A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_E) variou de 0,369 a 0,737 (média=0,613) e 0,440 a 0,543 (média=0,489), respectivamente. O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) foi baixo em todas as populações amostradas (-0,729 a 0,260, média = -0,348). Cinco populações (PAR, SLM, IPO, ALD e MAM) apresentaram desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$).

ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES AMOSTRADAS

O método proposto por Evanno *et al.* (2005) identificou $K=3$ como sendo o número de agrupamentos mais provável (Figura 7). A análise de agrupamento bayesiano implementada no *software* STRUCTURE para as proporções de mistura (Q) nas seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii* de acordo com $K=3$ está disponível na Figura 8.

Grande parte dos indivíduos das populações localizadas em Sergipe (*C. pirambuensis*) e Alagoas (*C. alagoanus*) (PIR-SE e PAR-AL) mostraram proporção de mistura associadas ao agrupamento I. Uma população de Pernambuco (*C. pickelii*) (SLM-PE) e uma de Paraíba (*C. alagoanus*) (MAM-PB) apresentaram proporção de mistura associada ao agrupamento II. Além disso, a população de Ipojuca (*C. alagoanus*) (IPO-PE), localizada em Pernambuco, apresentou uma estruturação genética bem definida e distinta das demais, sendo associada ao agrupamento III. Já a população de Aldeia (*C. pickelii*) (ALD-PE) apresentou uma proporção de mistura significativa entre o agrupamento II e III.

DISTÂNCIA E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA

A análise do teste de Mantel revelou que não houve relação entre as distâncias geográficas e as divergências genéticas obtidas entre as populações amostradas no complexo *Cryptanthus pickelii* ($p > 0,05$) (Figura 9). O coeficiente de determinação (r^2) foi baixo (0,0479), indicando que a distância espacial entre as populações explica apenas 4,79% da divergência genética entre as populações.

Em termos hierárquicos, a AMOVA revelou que 11,8% da variação genética ocorreu entre grupos (F_{CT}). A variação genética dentro das populações representou 24,1% (F_{SC}). A maior parte da variação genética, 64%, foi observada dentro das próprias populações (F_{ST}) (Tabela 10). No geral, a diferenciação genética foi maior dentro das populações ($F_{ST} = 0,35989$) do que entre populações dentro dos grupos ($F_{SC} = 0,27366$) e ainda mais do que entre os grupos ($F_{CT} = 0,11872$).

TAMANHO EFETIVO POPULACIONAL E TAXA DE MIGRAÇÃO

De acordo com o método proposto por Beerli & Felsenstein (1999), todas as subpopulações apresentaram um baixo número efetivo de migrantes (N_m), com menos de um migrante por geração. Os valores variam de 0,006 a 0,399. Os demais valores obtidos para as diferentes subpopulações do complexo *Cryptanthus pickelii* estão disponíveis na Tabela 10.

DISCUSSÃO

Em geral, os dados da morfometria e estrutura genética indicaram uma variação morfológica significativa no complexo *C. pickelii*. Apontando que as diferenciações morfológicas encontradas entre as populações tipos de *C. alagoanus* (PAR-AL) e *C. pirambuensis* (PIR-SE) não são congruentes com os agrupamentos genéticos formados. Assim, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* são consideradas uma única espécie. Nossos dados também

mostraram um novo registro de *C. pickelii* para o estado da Paraíba. Além disso, uma forte estruturação genética e diferenciação morfológica encontrada na população de Ipojuca-PE, nos fez levantar a hipótese de uma possível especiação híbrida com *C. zonatus*. As espécies continuam ameaçadas, e o status de conservação de *C. pickelii* foi reavaliado como em perigo (EN) e de *C. alagoanus* como criticamente em perigo (CR).

DADOS MORFOMÉTRICOS E MOLECULARES NA DELIMITAÇÃO DO COMPLEXO *Cryptanthus pickelii*

Como descrito por Ferreira & Louzada (2020), *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis* constituem um complexo de espécies. A hipótese de que esses táxons representam uma única espécie foi testada utilizando o conceito unificado de espécies proposto por De-Queiroz (2007), levando em consideração aspectos morfológicos e moleculares.

A análise morfométrica resultou em quatro grupos separados pela morfologia foliar e reprodutiva, evidenciado pela PCA e confirmado com os testes estatísticos realizados. O histórico taxonômico das espécies analisadas, com inúmeras sobreposições e morfo-lacunas, contribuiu para a difícil diferenciação morfológica do complexo *Cryptanthus pickelii*. No entanto, com a morfometria, foi possível detectar algumas discontinuidades e semelhanças suficientes para formação de agrupamentos morfológicos.

Nesta análise, o número de espécimes coletados para cada população foi desigual pela interferência de fatores como o pequeno tamanho populacional e o baixo número de amostras em estágio reprodutivo. De modo geral, com os padrões morfométricos obtidos nessa abordagem, foi possível distinguir morfotipos a partir das variáveis morfológicas analisadas. De fato, muitos caracteres citados como úteis nas descrições taxonômicas de Leme & Siqueira-Filho (2001) e Ferreira & Louzada (2022) para diferenciar as espécies de complexo *Cryptanthus pickelii* (CPFME, CPFMA, LFME, LFMA, CSME, CSMA, CPME, CPMA, NFCA e NFCL)

foram corroborados neste estudo, apresentando diferenças ou semelhanças pontuais entre as populações. Onde, os caracteres reprodutivos foram os mais consistentes e úteis na delimitação das espécies, revelando descontinuidades morfológicas significativas. Trabalhos semelhantes também indicaram que caracteres florais foram os mais importantes na delimitação de outras espécies de Bromeliaceae (Costa *et al.* 2009; Pinzón *et al.* 2011; Neves *et al.* 2018).

Através da morfometria, constatou-se que os indivíduos das populações ALD e SLM, originalmente descritas por Smith (1955) como *Cryptanthus pickelii* se agruparam e fazem parte de uma mesma unidade biológica, corroborando com as descrições de Leme & Siqueira-Filho (2007). A população de PIR, descrita por Ferreira & Louzada (2022) como uma nova espécie (*C. pirambuensis*), apresentou diferença morfológica significativa em relação a alguns caracteres encontrados em *C. alagoanus* (PAR) e *C. pickelii* (SLM).

Apesar de apresentar semelhanças em alguns caracteres analisados, as populações de MAM e IPO diferiram estatisticamente de PAR nas análises, não podendo ser confirmada a atual circunscrição de Leme & Siqueira-Filho (2007) como *C. alagoanus*. Além disso, MAM compartilha algumas características morfológicas com ALD e SLM, indicando uma relação mais próxima de *C. pickelii*.

Nossos resultados morfométricos confirmam que atualmente existe mais de uma entidade biológica sendo tratada como *C. alagoanus*. Através da morfometria, foram identificadas três populações morfológicamente distintas (PAR, IPO e MAM) descrita inicialmente por Leme Siqueira-filho (2007) como *C. alagoanus*. No entanto, IPO difere estatisticamente de PAR (população tipo de *C. alagoanus*) em todos os testes estatísticos realizados, não podendo ser tratada como *C. alagoanus*.

Através da análise bayesiana, foram identificados três agrupamentos genéticos (K=3). A diferenciação genética entre os agrupamentos foi superior ($F_{CT}=0,118$, $P=0,0381$) aos valores

encontrados em *Cryptanthus zonatus* ($F_{CT}=0,054$ $P=0.005$; Ferreira *et al.* 2020), e semelhante ao encontrado em *Vriesea simplex* (Vell.) Beer e *V. scalaris* É. Morren ($F_{CT}=0,109$, $P<0,001$; Neri, Wendt & Palma-Silva, 2018). Portanto, os resultados da estrutura genética revelaram que não há diferenciação entre as populações de *C. alagoanus* (PAR-AL) e *C. pirambuensis* (PIR-SE), indicando que pertencem a uma mesma unidade taxonômica dentro do agrupamento I. Dessa forma, os caracteres diagnósticos utilizados na morfometria e indicados por Leme & Siqueira-Filho (2007) e Ferreira & Louzada (2022) para diferenciar as espécies, devem ser interpretados apenas como uma variabilidade morfológica intraespecífica.

Embora as populações de *C. alagoanus* e *C. pickelii* mostrem diferenciação na estrutura genética, o que sustenta sua classificação como espécies distintas, é importante ressaltar que a distribuição das espécies não está de acordo com o apresentado por Leme & Siqueira-Filho (2007). Neste trabalho, foi identificado que a morfologia e a estrutura genética da população de Mamanguape, localizada em Paraíba, é mais semelhante com às populações de *C. pickelii* (ALD-PE e SLM-PE) do que *C. alagoanus* (PAR-AL), sendo classificadas no agrupamento II (Figura 8), essa relação também foi evidenciada na filogenia do gênero proposta por Ferreira *et al.* (2021), onde a linhagem de Paraíba (MAM) passou a ser incluída no clado *pickelii*.

Além disso, a população de Ipojuca, localizada em Pernambuco, previamente identificada por Leme & Siqueira-Filho (2007) como *C. alagoanus*, apresentou uma estrutura genética diferente das demais populações, sendo classificada no agrupamento III. Esse resultado, integrado com as análises morfométricas, fortalece a hipótese de que essa população se encontra em processo de especiação híbrida com *C. zonatus*, ambos são simpátricos na “Mata do Cupe”, em Ipojuca - PE. Oliveira-Júnior (2015) observou que os espécimes compartilham aspectos fenológicos e os mesmos polinizadores. Em um experimento de cruzamento *in situ*, ele registrou a formação de frutos em cerca de 30% das amostras analisadas, sugerindo a possibilidade de hibridação entre as espécies. Os dados da filogenia apresentados por Ferreira

et al. (2021), também corroboram com essa hipótese, onde esperava-se que IPO fosse classificado no clado *pickelii*, mas emergiu como irmão de *C. zonatus*, no clado *zonatus*. Esses mesmos autores afirmam que IPO possui morfologia discordante de *C. pickelii*, *C. alagoanus* e *C. zonatus*, podendo estar em processo de especiação híbrida, corroborando com os dados morfométrico e moleculares apresentado neste trabalho.

De acordo com Ellstrand *et al.* (1996), a hibridação natural foi responsável por grande parte da diversificação em angiospermas. No entanto, a dificuldade em reconhecer híbridos naturais resultou em uma série de problemas taxonômicos encontrados em Bromeliaceae, sendo documentadas pelos trabalhos de Rôças *et al.* (2004) e Palma-Silva *et al.* (2011). Estudos realizados por Zanella *et al.* (2016) em espécies de *Vriesea* Lindl., também destacaram a dificuldade de classificar os híbridos com base em uma única abordagem. Além disso, Schulte *et al.* (2010) já haviam concluído que a detecção de híbridos em Bromeliaceae é difícil quando se utiliza apenas caracteres morfológicos. Para identificar híbridos naturais, várias técnicas têm sido utilizadas, comumente combinando análises morfométricas e estudos moleculares (Blackstock & Ashton, 2010; Snow *et al.* 2010; Geiger *et al.* 2016).

Assim como encontrado neste estudo, espécies estreitamente relacionadas têm uma maior tendência de hibridizar (Abbott *et al.* 2013). Casos de hibridização natural entre espécies de Bromeliaceae tem sido documentada na literatura pelos trabalhos de Schulte *et al.* 2010; Palma-Silva *et al.* 2011; Versieux *et al.* 2012; Neri *et al.* 2018 e Mota *et al.* 2019. Embora a hibridação possa resultar na redução ou perda da diferenciação genética, ela também pode desempenhar um papel importante como uma fonte de variação adaptativa, contribuindo para o processo de especiação (Tavares *et al.* 2022). Assim como mencionado por Ferreira *et al.* (2021), a população de IPO pode estar acumulando variações genéticas, diferindo-se de *C. alagoanus* e *C. zonatus*. No entanto, são necessários estudos para confirmar o achado, visto que a população simpátrica de *C. zonatus* não foi amostrada neste trabalho.

DIVERSIDADE GÉNÉTICA DO COMPLEXO *CRYPTANTHUS PICKELII* E IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES

A diversidade genética dada pela heterozigosidade esperada (H_E) nas populações estudadas do complexo *Cryptanthus pickelii* mostrou-se moderada em relação a outras espécies de Bromeliaceae que ocorrem na Floresta Atlântica, como *Vriesea gigantea* Gaudich. (Palma-Silva *et al.* 2009) e *Bromelia antiacantha* Bertoloni (Zanella *et al.* 2011). Sendo similar ou superior aos valores encontrados por Ferreira *et al.* (2020) para o complexo *Cryptanthus zonatus* baseados em dados de microssatélites nucleares.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que *Cryptanthus alagoanus* e *C. pirambuensis* são dois nomes dados à mesma espécie. Apesar das diferenças morfológicas identificadas pela morfometria, não houve diferenciação na estrutura genética dessas duas populações (PAR e PIR). Neste caso, a diferenciação morfológica dos morfotipos está relacionada às adaptações ao ambiente, frequentemente encontrada dentro de Bromeliaceae (Cavallero *et al.* 2009; Castello & Galetto, 2013; Uribe *et al.* 2020; Silva *et al.* 2020), e documentada em *Cryptanthus* pelo trabalho de Ferreira *et al.* (2020), onde *Cryptanthus burlemarxii* Leme foi sinonimizado a *C. zonatus* com base em dados filogeográficos. Diante disso, sugere-se que *C. pirambuensis* seja sinonimizado a *C. alagoanus*, que é nome mais antigo, e tem prioridade de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas.

Os dados morfométricos e moleculares, mostraram que a população de Mamanguape - Paraíba, considerada por Leme & Siqueira-Filho (2007) como *C. alagoanus*, apresentou uma semelhança morfológica e maior estruturação genética ligada às populações de ALD e SLM, passando a ser considerada como *C. pickelii*. Dessa forma, este trabalho apresenta o primeiro registro de *C. pickelii* para o estado da Paraíba. Além disso, reforçamos a hipótese de que a

população de Ipojuca, localizada em Pernambuco, está em processo de especiação híbrida com *C. zonatus*, não podendo ser tratada como *C. alagoanus*, como era descrita por Leme & Siqueira-Filho (2001).

Através desse trabalho, foi identificado que existem poucas populações de *C. alagoanus* e *C. pickelii*, onde algumas possuem um baixo tamanho populacional, com um número considerável de clones, como observado em SLM-PE (9) e PAR-AL (7). De acordo com DeSalle & Amato (2004) o tamanho populacional é um dos fatores mais importantes ao identificar populações prioritárias para a conservação. Onde, a redução do tamanho efetivo populacional ocasiona a diminuição da diversidade genética, interferindo no potencial adaptativo da espécie frente às mudanças ambientais devido à perda de alelos (Lande, 1993; Ouborg, 2010).

Neste caso, a população de IPO-PE apresentou um número considerável de alelos ($A=14$), riqueza alélica ($AR=2,293$) e heterozigosidade esperada ($H_E=0,730$) e observada ($H_O=0,440$). Das seis populações amostradas, a população de IPO-PE encontra-se completamente fora de unidades de conservação. Ferreira *et al.* (2020), também indicaram essa área como prioritária para o estabelecimento de uma unidade de conservação.

Como estamos sinonimizando *C. pirambuensis* a *C. alagoanus* e identificamos um novo registro de *C. pickelii* para o estado da Paraíba, reavaliemos o status de conservação das espécies, onde *C. pickelii* foi reavaliado como em perigo (EN) ($EOO=4,585.022\text{km}^2$; $AOO=28.000\text{km}^2$) e de *C. alagoanus* como criticamente em perigo (CR) ($EOO=84.695\text{km}^2$; $AOO=12.000\text{km}^2$). Ambas as espécies possuem áreas de ocorrência bastante fragmentadas.

Com base nos resultados obtidos, fica evidente a necessidade de priorizar a conservação *in situ* dessas populações. Além de fortalecer a fiscalização nas unidades de conservação já existentes, como ALD-PE, SLM-PE, MAM-PB e PAR-AL, é necessário estabelecer duas novas unidade de conservação, na Mata do Cupe em Ipojuca (Pernambuco) e na Mata da Sambaíba em Pirambu (Sergipe). A perda de qualquer uma dessas populações resultaria em uma redução

significativa da variabilidade genética, uma vez que a diferenciação genética entre as populações é considerada alta ($F_{ST}=0.35989$). Por tanto, a criação dessas novas unidades de conservação é fundamental para garantir a proteção e preservação da diversidade genética dessas populações. Adicionalmente, conforme indicado por Ferreira *et al.* (2020), é importante intensificar o trabalho de campo em busca de novas áreas de ocorrência para realizar ações de conservação antes que subpopulações sejam perdidas.

CONCLUSÕES

No geral, as relações de similaridade e descontinuidade de caracteres encontradas dentro do grupo estudado levaram a ambiguidades taxonômicas, incluindo descrições taxonômicas inconsistentes em *Cryptanthus*, podendo ser atribuído aos eventos históricos de hibridação. Os resultados obtidos mostram que *Cryptanthus alagoanus* e *C. pirambuensis* são dois nomes dados à mesma espécie. Dessa forma, sugere-se que *C. pirambuensis* seja sinonimizado a *C. alagoanus*. Além disso, foi registrado a ocorrência de *C. pickelii* no estado da Paraíba, onde era anteriormente considerada como *C. alagoanus*. Também foi levantado a hipótese de que a população de Ipojuca, em Pernambuco, está em processo de especiação híbrida com *C. zonatus*, necessitando de estudos futuros. Para conservação das espécies, sugere-se a implementação de uma fiscalização mais efetiva nas unidades de conservação já existentes, bem como o estabelecimento e ampliação de outras unidades de conservação.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida. Ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Prospecção e Gestão da Biodiversidade do Nordeste (NPGBio) da UFPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Zinner D. 2013.** Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **26(2): 229– 246.**
- Adams M, Raadik TA, Burridge CP, Georges A. 2014.** Global biodiversity assessment and hyper-cryptic species complexes: more than one species of elephant in the room?. *Systematic Biology*, **63(4): 518-533.**
- Aoki-Gonçalves F, Louzada RB, Souza LM, Palma-Silva C. 2014.** Microsatellite loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to Neotropical rock outcrops. *Applications in plant sciences*, **2(3): 1-4.**
- Belo DB, Buril MR, Arruda E, Louzada RB. 2023.** Disentangling the identity of two *Jacquemontia* Choisy (Convolvulaceae Juss.) species using an integrative approach. *Brazilian Journal of Botany*, **1-17.**
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Winkler K, Indram KK, Das I. 2007.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, **22(3): 148-155.**
- Blanckstock N, Ashton PA. 2010.** Genetic markers and morphometric analysis reveal past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s. str. (Cyperaceae) hybrid populations. *Plant Systematics and Evolution*, **287: 37-47.**
- Bueno-Silva, M. 2012.** Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. *Estudos de Biologia*, **34(83).**

- Bünger MO, Einsehlor P, Figueiredo MLN, Stehmann JR. 2016.** Resolving species delimitations in the *Eugenia involucrata* Group (*Eugenia* sect. *Phyllocalyx*-Myrtaceae) with morphometric analysis. *Systematic Botany*, **40(4)**: 995-1002.
- Castello LV, Galetto L. 2013.** How many taxa can be recognized within the complex *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae, Tillandsioideae)? Analysis of the available classifications using a multivariate approach. *PhytoKeys*, **(23)**:25.
- Cavallero L, López D, Barberis IM. 2009.** Morphological variation of *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) in a Chaco forest: habitat and size-related effects. *Plant Biology*, **11(3)**: 379-391.
- Costa AF; Rodrigues PJFP; Wanderley MGL. 2009.** Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **159(1)**: 163-181.
- Cruz GAS, Zizka G, Silvestro D, Leme EMC, Schulte K, Benko-Iseppon AM. 2017.** Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **107**: 152-165.
- Csardi G. 2019.** iGraph: network analysis library. R package version 1.0.1. Accessed in: <<https://github.com/igraph/igraph>>.
- Dieringer D, Schlötterer C. 2003.** Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molec Ecol Notes*. **3**: 167–169.
- Duminil J, Di-Michele, M. 2009.** Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems*, **143(3)**: 528-542.
- Ellstrand NC, Whitkus R, Rieseberg LH. 1996.** Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**: 5090- 5093.

- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**: 47–50.
- Excoffier L, Lischer, Heidi EL. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, **10(3)**: 564-567.
- Ferreira DMC, Louzada RB. 2022.** Two new species of *Cryptanthus* (Bromelioideae, Bromeliaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil. *Phytotaxa*, **571(1)**: 65-75.
- Ferreira DMC, Néri J, Palma-Silva C, Pinangé DS, Benko-Iseppon AN, Louzada RB. 2017.** Cross-amplification of nuclear microsatellite markers two species of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Botany*, **40(2)**: 475-480.
- Ferreira DMC, Palma-Silva C, Néri J, Medeiros MCMP, Pinangé DS, Benko-Iseppon AN, Louzada RB. 2020.** Population genetic structure and species delimitation in the *Cryptanthus zonatus* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **196(1)**:123-140.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1995.** Introdução ao uso de marcadores em análises genéticas. Brasília: *Embrapa-Cenargen*.
- Fidalgo O, Bononi VLR. 1989.** Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. *Reimpressão*. Instituto de Botânica, São Paulo. **62p**.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira-Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L. 2015.** Bromeliaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

- Fujita MK, Leanché AD, Burbrink FT, McGuire JA, Moritz C. 2012.** Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, 27(9): 480-488.
- Gage E, Wilkin P. 2008.** A morphometric study of species delimitation in *Sternbergia lutea* (Alliaceae, Amaryllidoideae) and its allies *S. sicula* and *S. greuteriana*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **158(3): 460-469.**
- Galili T. 2015.** Dendextend: na R package for visualizing, adjusting e comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*, (22): p.1-2.
- Geiger MF, Schreiner C, Delmastro GB. 2016.** Combining geometric morphometrics with molecular genetics to investigate a putative hybrid complex: a case study with barbels *Barbus* spp. (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Fish Biology*, **88(3): 1038-1055.**
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Riina BVER, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith AC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American journal of botany*, 98(5): 872-895.
- Gouda EJ, Butcher D.** A list of accepted Bromeliaceae names. [<http://bromeliad.nl/bromNames/>]. *Jardim Botânico Universitário*, Utrecht
- Gross J, Ligges U.** nortest: tests for normality. R package version 1.0–4. <https://CRAN.R-project.org/package=nortest>
- Grube M, Kroken, S. 2000.** Molecular approaches and the concept of species and species complexes in *Lichenized fungi*. *Mycological Research* **104: 1284-1294.**
- Hausdorf B, Hennig C. 2010.** Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Systematic Biology*, **59(5): 491-503.**

- Henderson A. 2006.** Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151(1): 103-111**.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2009.** Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9:1322–1332**.
- IUCN Standards and Petitions Subcommittee. 2019.** Guidelines for using the IUCN red list categories and criteria. Version 14. Standards and Petitions Subcommittee. Available from: <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf> (**accessed on february 1, 2023**).
- Kassambara A., & Mundt F. 2016.** Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. *R Package Version*, **1(3)**.
- Lê S, Josse J, Husson F. 2008.** FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, **25(1), 1-18**.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA. 2001.** Studies in Bromeliaceae of Northeastern Brazil. *I. Selbyana*, **146-154**.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA. 2007.** Bromeliad taxonomy in Atlantic Forest fragments of Pernambuco and Alagoas. *Fragments of the Atlantic Forest of Northeast Brazil*, **191-378**.
- Maciel JR. 2020.** *Cryptanthus* in Flora do Brasil 2020. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5991>>. Acesso em: 24 out. 2022
- Mallet J. 1995.** A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution* **10: 294–299**.

- Mota, MR. 2015.** Estudo da hibridação entre espécies do gênero *Pitcairnia* (Bromeliaceae) através de marcadores plastidiais.
- Neffa VG. 2010.** Geographic patterns of morphological variation in *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* (Turneraceae). *Plant Systematics and Evolution*, **284**: 231-253.
- Neri J, Wendt T, Palma-Silva C. 2018.** Natural hybridization and genetic and morphological variation between two epiphytic bromeliads. *AoB Plants*, **10(1)**: 1061.
- Neves B, Uribbe FP, Jacques SSA, Zanella CM, Costa AF. 2018.** Species boundaries in the *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae) complex after a broad morphometric and taxonomic study. *Systematic Botany*, **43(4)**: 870-888.
- Padial JM, Miralles A, Riva I, Vences M. 2010.** The integrative future of taxonomy. *frontiers in Zoology*, **7 (1)**, 1–14.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2007.** A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*, **7(4)**: 654-657.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini. 2009.** Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity*, **103(6)**: 503-512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Michael-Fay F, Fay S, Cozzolino S, Lexer C. 2011.** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology Notes*, **v. 20**, p. 3185–320, 2011.
- Pante E, Puillandre N, Viricel A, Arnaoud-Haond S, Aurelle D, Castelin M, Chenuil A, Destombe C, Forcioli D, Valero M, Viard F, Samadi S. 2015.** Species are hypotheses:

avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology*, **24(3): 525-544**.

Pinzón JP, Ramírez-Morillo IM, Fernández-Concha GCi. 2011. Morphometric analyses within the *Tillandsia utriculata* L. complex (Bromeliaceae) allow for the recognition of a new species, with notes on its phylogenetic position1. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, **138(4): 353-365**.

Prata EMB. 2016. Delimitação de espécies e história de diversificação do complexo *Pagamea guianensis* (Rubiaceae) na América do Sul Tropical.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inferência da estrutura populacional utilizando dados genótipos multilocus. *Genética*, **155(2): 945- 959**.

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Ramírez-Morillo IM. 1996. Systematics, phylogeny, and chromosome number evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Tese de Doutorado*. University of Missouri-Saint Louis.

Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered* **86: 248-249**.

Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science*, **317(5840): 910-914**.

Rôças G, Klein DE, De-Mattos EA. 2004. Artificial hybridization between *Pitcairnia flammea* and *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae): analysis of the performance of parents and hybrids. *Plant Species Biology*, **v. 19, p. 47–53**.

Schulte K, Silvestro D, Kiehlmann E, Vesely S, Novoa P, Zizka G. 2010. Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **57(3): 1105-1119**.

- Silva KS, Versieux LM, Oriani A. 2020.** Morphological and anatomical variations of roots, leaves, peduncles, and peduncle bracts in the *Vriesea oligantha* complex (Bromeliaceae): Perspectives for taxonomy. *Systematic Botany*, **45(4):779-793**.
- Siqueira-Filho JÁ, Machado IC. 2008.** Flowering phenology and pollination ecology of *Cryptanthus diana* Leme: a case of floral fragrance-collecting by Euglossinae bees in Bromeliaceae. *Selbyana*, **226-232**.
- Smith LB. 1955.** The Bromeliaceae of Brazil. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, **290**.
- Snow AA, Travis SE, Wildová R, Fér T, Sweeney PM, Marburger JE, Windels S, Kubátová B, Goldberg DE, Mutegi E. 2010.** Species-specific SSR alleles for studies of hybrid cattails (*Typha latifolia* × *T. angustifolia*; Typhaceae) in North America. *American Journal of Botany*, **97(12): 2061-2067**.
- Temponi LG, Garcia FCP, Sakuragui CM, Carvalho-Okano RM. 2005.** Morphological diversity and life forms in araceae from the Rio Doce State Park, Minas Gerais. *Rodriguésia*, **56: 03-13**.
- Uribe FP, Neves B, Almeida-Jacques SS, Ferreira AC. 2020.** Morphological variation in the *Vriesea procera* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) in the Brazilian Atlantic Rainforest, with recognition of new taxa. *Systematic Botany*, **45(1):53-68**.
- Valière N. 2002.** GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* **2: 377–379**.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004.** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4: 535-538**.
- Wahlsteen E, Tyler T. 2019.** Morphometric analyses and species delimitation in *Legousia* (Campanulaceae). *Willdenowia*, **49(1): 21-33**.

- Watanabe, MTC. 2009.** Análise morfométrica e variabilidade morfológica em populações de *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo.
- Weising K, Nybom H, Wollff K, Kahl G. 2005.** DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. Taylor & Francis.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD'A, François R, Grolemond G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. 2019.** Welcome to the tidyverse. *J Open Source Soft*, **4(43): 1686**.
- Wickham H, François R, Henry L, Müller K. 2021.** dplyr: a grammar of data manipulation. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Wiens JJ. 2007.** Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic biology*, **56(6): 875-878**.
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi CM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F. 2001.** Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, **98(9): 1511-1519**.
- Zanella CM, Palma-Silva C, Goetze M, Bered F. 2016.** Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181(3): 491-504**.
- Zolet ACT, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. 2007.** Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações.

Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, & Mayrose I. 2015. CLUMPAK:
a program for identifying clustering modes and packaging population structure
inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179-1191.

ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do complexo *Cryptanthus pickelii* ao longo da Floresta Atlântica do Nordeste do Brasil.

Populações coletadas: Mamanguape – PB (MAM) – *Cryptanthus alagoanus*, Aldeia - PE (ALD) – *C. pickelii*, São Lourenço da Mata – PE (SLM) – *C. pickelii*, Ipojuca – PE (IPO) – *C. alagoanus*, Paripueira – AL (PAR) – *C. alagoanus* e Pirambu – SE (PIR) *C. pirambuensis*.

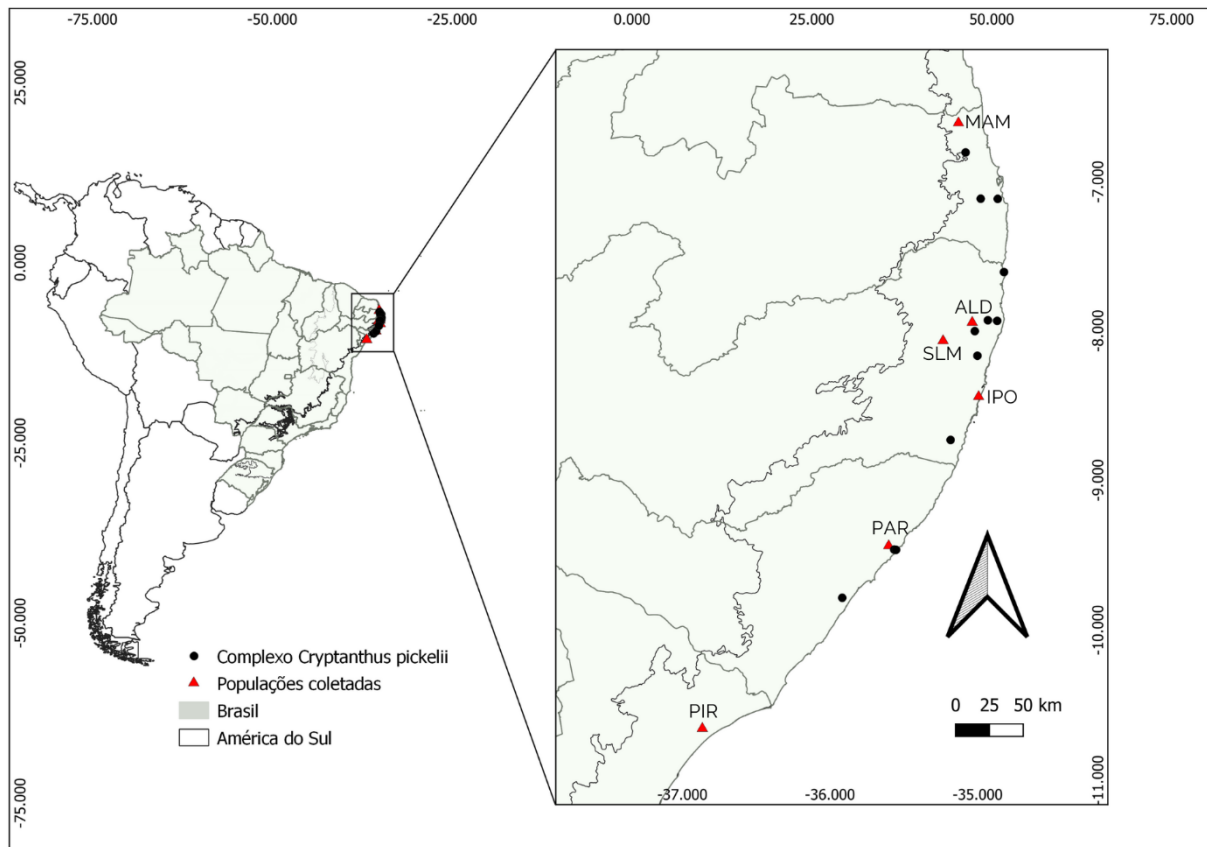


Figura 2. Seis populações amostradas no complexo *Cryptanthus pickelii*. **A** - *C. pickelii* em Aldeia - PE. **B** - *C. pickelii* em São Lourenço da Mata - PE. **C** - *C. alagoanus* em Paripueira - AL. **D** - *C. alagoanus* em Mamanguape - PB. **E** - *C. alagoanus* em Ipojuca - PE. **F** - *C. pirambuensis* em Pirambu - SE

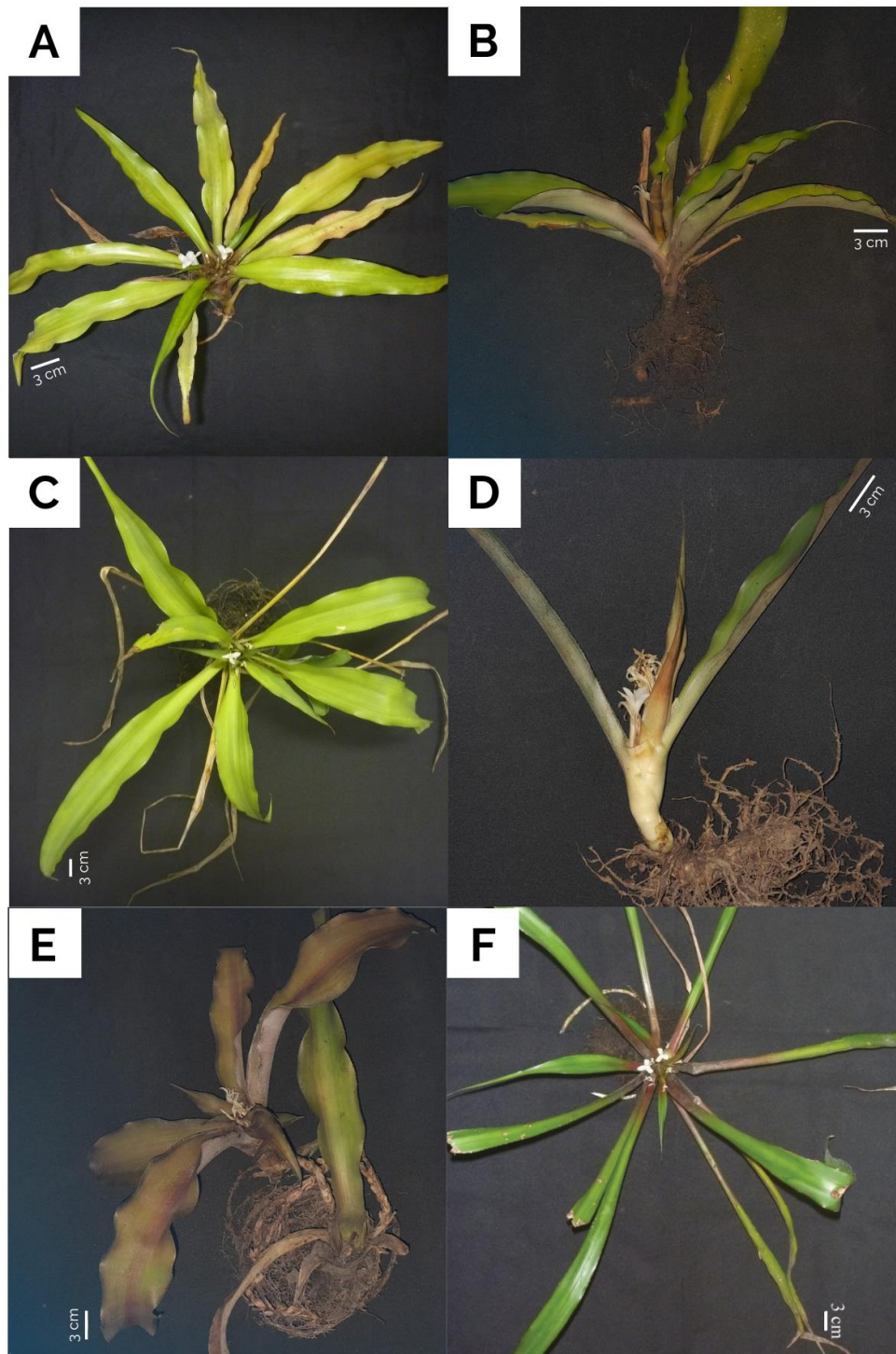
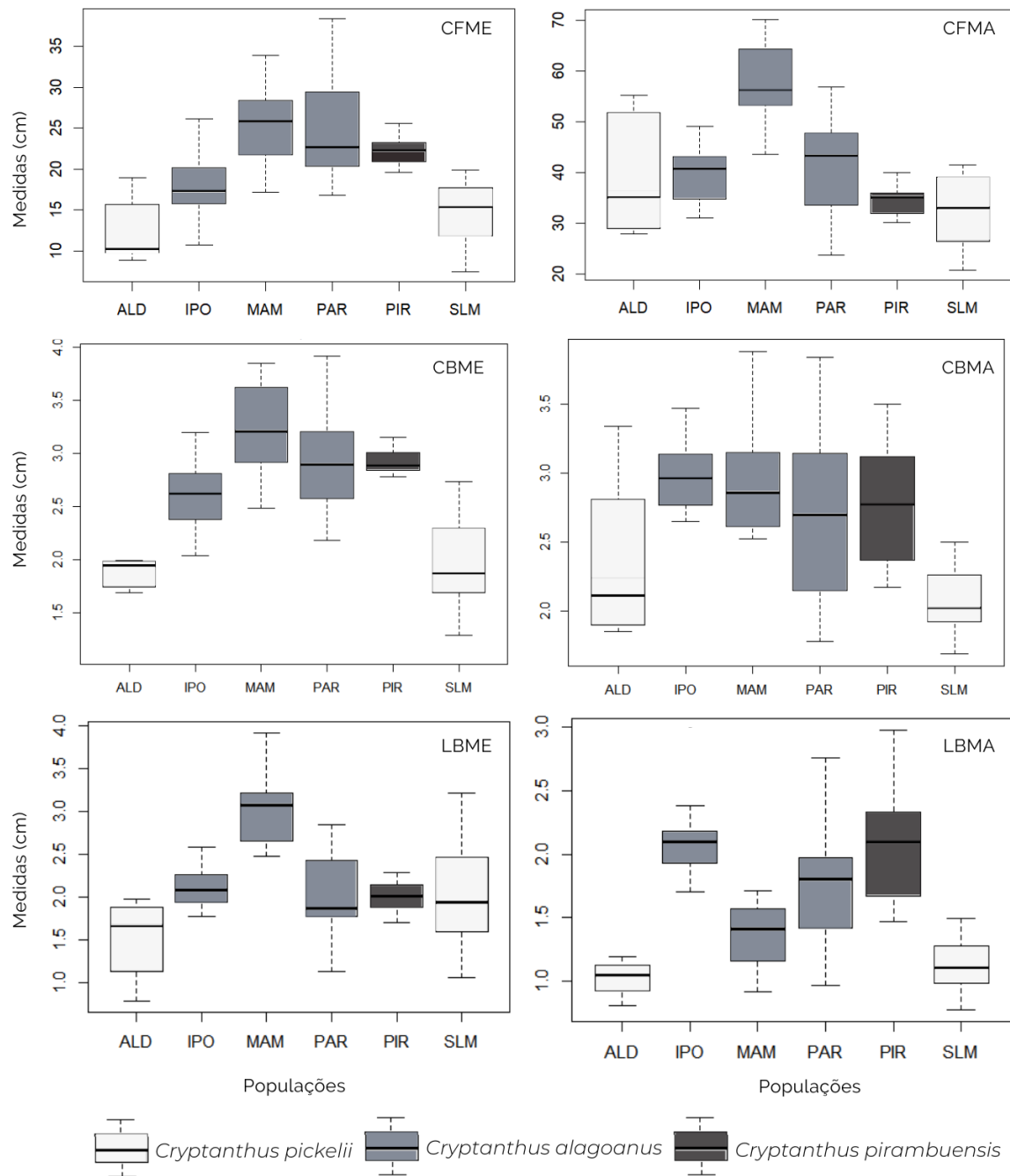
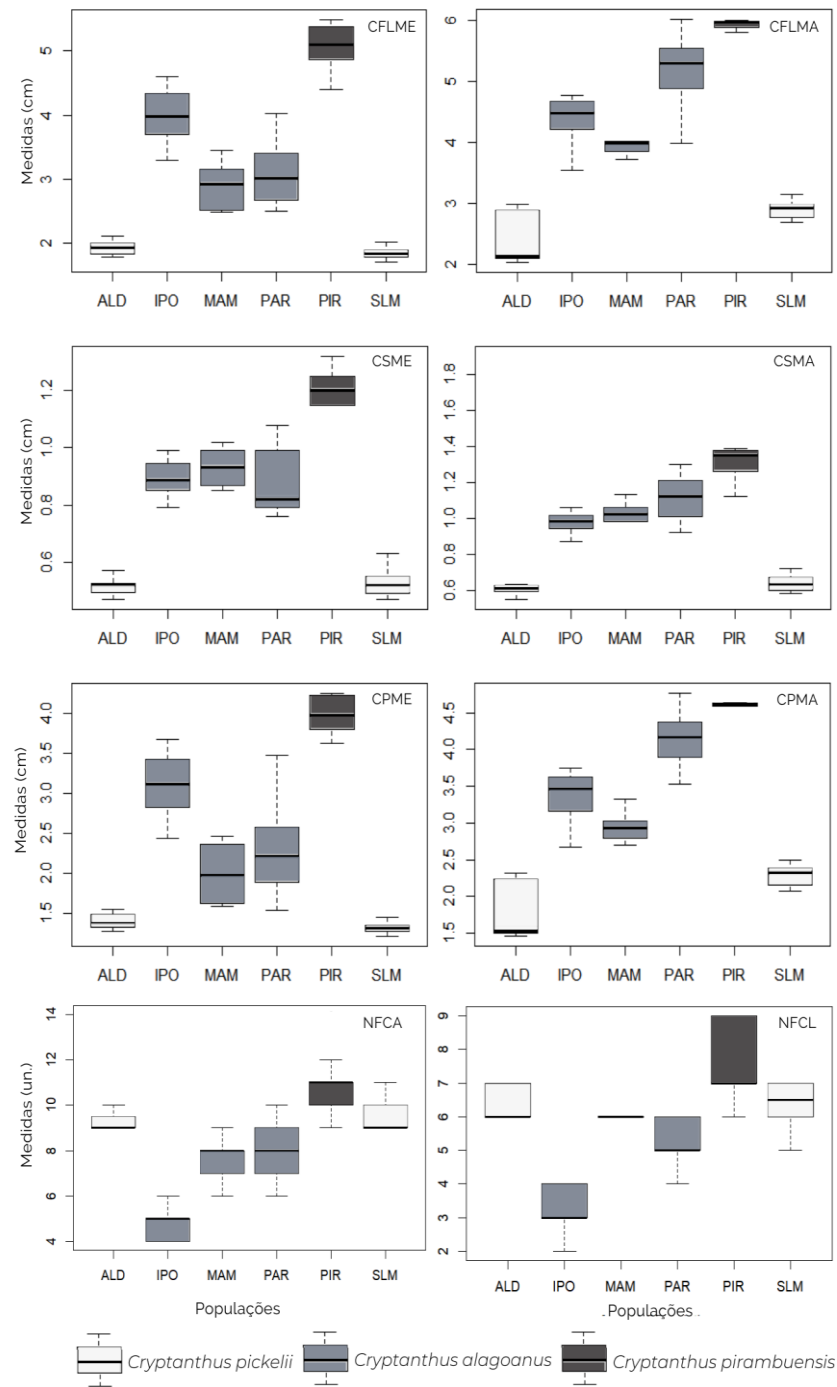


Figura 3. Gráfico Box plot representando as discontinuidades e semelhanças para cada estrutura vegetativa medida nas seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.



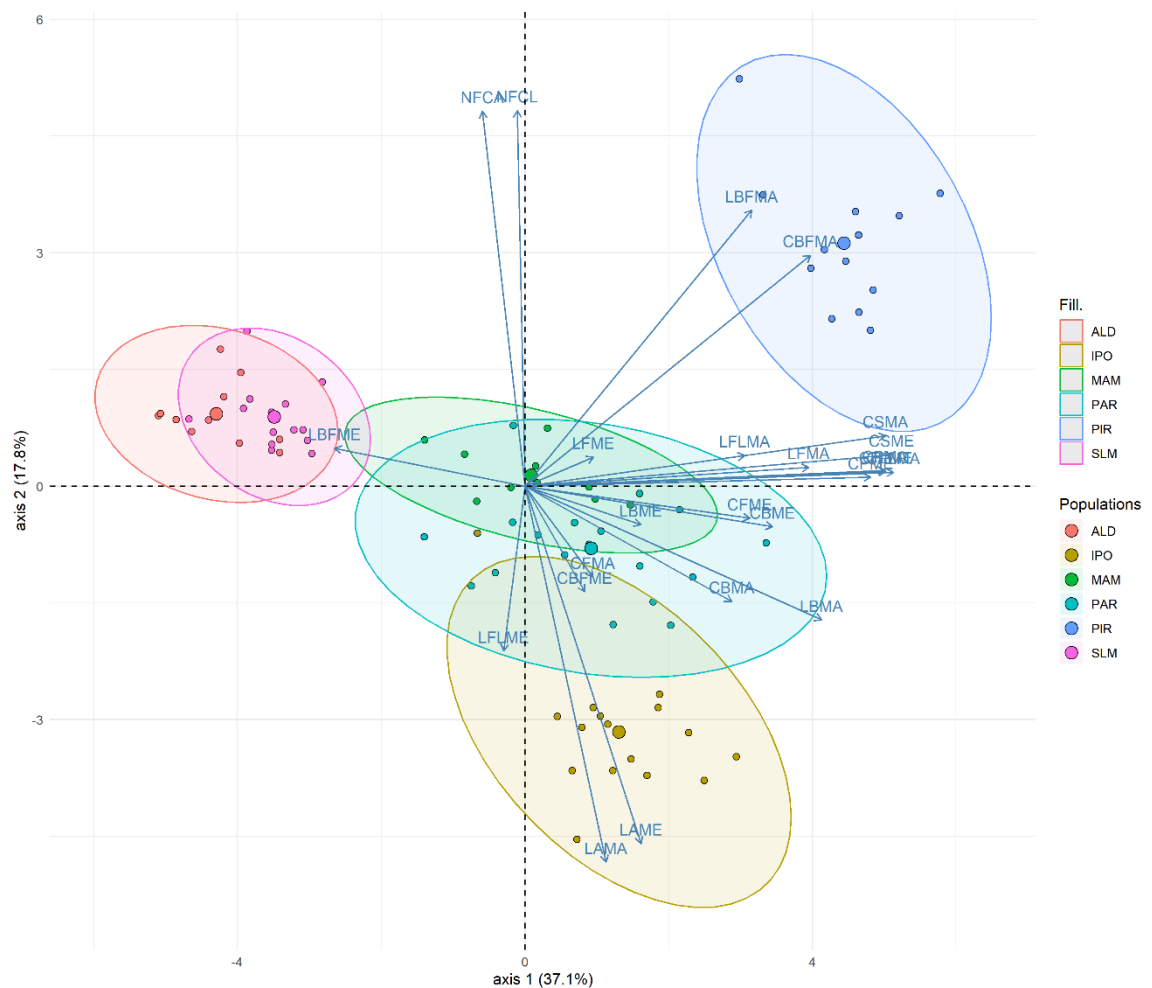
Medidas: CFME – comprimento da folha menor; CFMA – comprimento da folha maior; CBFME - comprimento da bainha da folha menor; CBFMA - comprimento da bainha da folha maior; LBME – largura da base da folha menor; LBMA - largura da base da folha maior. Populações: ALD – Aldeia (*Cryptanthus pickelii*); IPO – Ipojuca (*C. alagoanus*); MAM – Mamanguape (*C. pickelii*); PAR – Paripueira (*C. pirambuensis*); PIR – Pirambu (*C. pickelii*); SLM – São Lourenço da Mata (*C. pickelii*).

Figura 4. Gráfico Box plot representando as discontinuidades e semelhanças para cada estrutura reprodutiva medida nas seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.



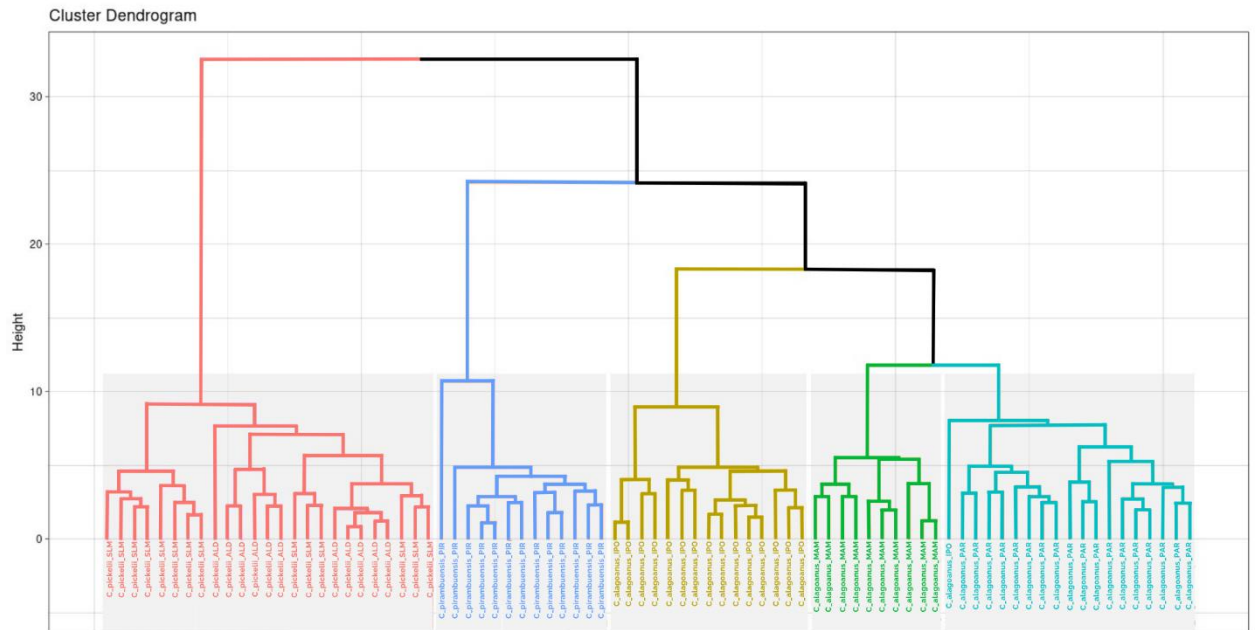
Medidas: CFLME – comprimento da flor menor; CFLMA – comprimento da flor maior; CSME – comprimento da sépala menor; CSMA – comprimento da sépala maior; CPME – comprimento da pétala menor; CPMA – comprimento da pétala maior; NFCA – número de flores na parte apical da inflorescência; NFCL – número de flores na parte lateral da inflorescência. Populações: ALD – Aldeia (*Cryptanthus pickelii*); IPO – Ipojuca (*C. alagoanus*); MAM – Mamanguape (*C. pickelii*); PAR – Paripueira (*C. pirambuensis*); PIR – Pirambu (*C. pickelii*); SLM – São Lourenço da Mata (*C. pickelii*).

Figura 5. Análise de componentes principais (PCA), baseada em 24 caracteres morfológicos de indivíduos de seis populações (ALD – Aldeia, IPO – Ipojuca, MAM – Mamanguape, PAR – Paripueira, PIR – Pirambu e SLM – São Lourenço da Mata) do complexo de espécie *Cryptanthus pickelii* (Bromeliaceae).



Variáveis analisadas: comprimento da folha menor (CFME), comprimento da folha maior (CFMA), largura da folha menor (LFME), largura da folha maior (LFMA), comprimento da base da folha menor (CBME), comprimento da folha maior (CBMA), largura da base da folha menor (LFME), largura da base da folha maior (LFMA), largura do ápice da folha menor (LAME), largura do ápice da folha maior (LAMA), comprimento da bainha da folha menor (CBFME), comprimento da bainha da folha maior (CBFMA), largura da bainha da folha menor (LBFME), largura da bainha da folha maior (LBFMA), comprimento da flor menor (CFLME), comprimento da flor maior (CFLMA), largura da flor menor (LFLME), largura da flor maior (LFLMA), comprimento da sépala menor (CSME), comprimento sépala maior (CSMA), comprimento da pétala menor (CPME), comprimento da pétala maior (CPMA), número de flores na parte apical da inflorescência (NFCA) e número de flores na parte lateral da inflorescência (NFCL).

Figura 6. Dendrograma demonstrando a análise de cluster baseada em 24 caracteres morfológicos de indivíduos de seis populações do complexo de espécies *Cryptanthus pickelii* (Bromeliaceae).



Populações: ALD – Aldeia (*Cryptanthus pickelii*); IPO – Ipojuca (*C. alagoanus*); MAM – Mamanguape (*C. alagoanus*); PAR – Paripueira (*C. alagoanus*); PIR – Pirambu (*C. pirambuensis*); SLM – São Lourenço da Mata (*C. pickelii*).

Figura 7. Magnitude do Delta K da análise de estrutura genética para os dados de microssatélites nucleares em seis populações do complexo *Cryptanthus pickelli*. O melhor valor de K foi calculado pelo método proposto por Evanno *et al.* (2005). O valor dessas distribuições indica o K mais provável, sendo o K=3 (três agrupamentos genéticos).

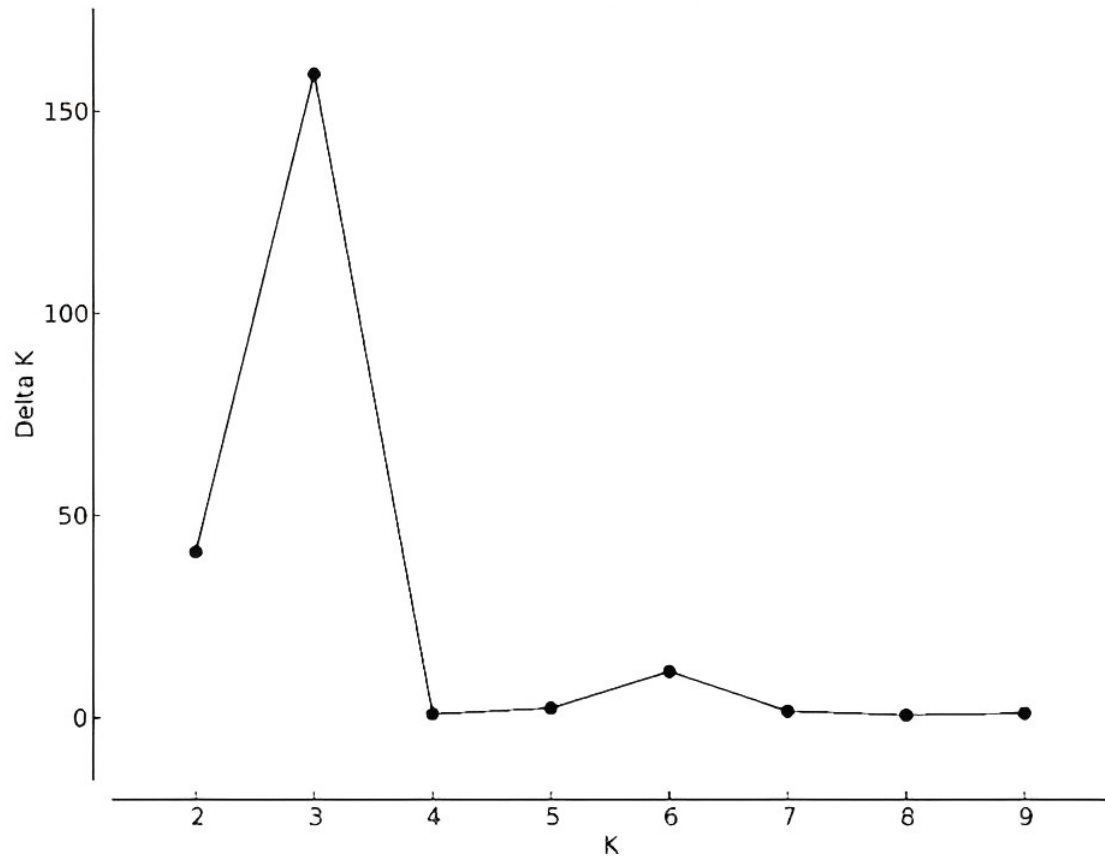
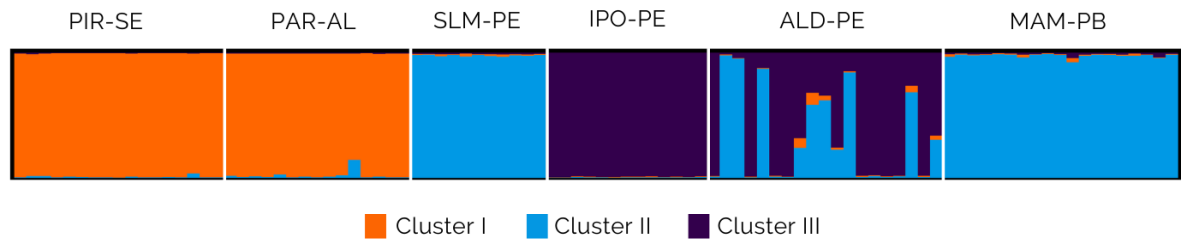
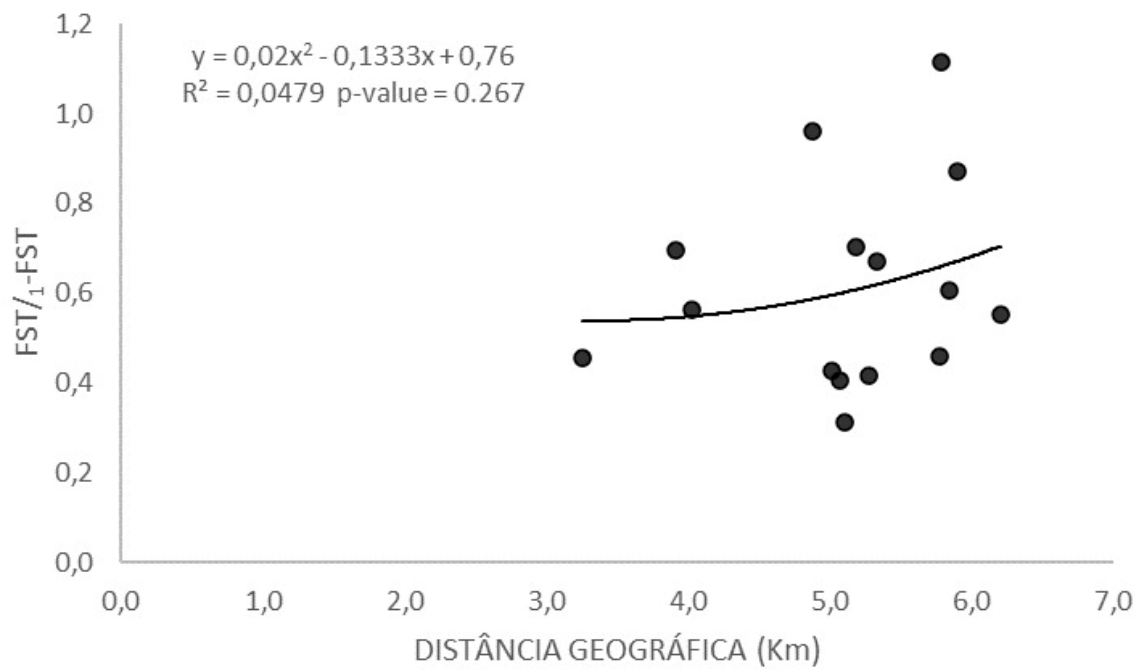


Figura 8. Proporção de mistura (Q) para cada indivíduo do complexo *Cryptanthus pickelii*, com base no número de agrupamentos mais provável K=3 (três agrupamentos genéticos). Os três agrupamentos genéticos identificados pelo STRUCTURE estão indicados em cores diferentes. As seis populações estão separadas por barras verticais.



Populações: Pirambu - Sergipe (PIR-SE); Paripueira - Alagoas (PAR-AL); São Lourenço da Mata - Pernambuco (SLM-PE); Ipojuca - Pernambuco (IPO-PE); Mamanguape - Paraíba (MAM-PB).

Figura 9. Gráfico de dispersão representando a correlação do teste de Mantel para a distância genética e distância geográfica (p-value=0.267; $r^2=0.0479$).



TABELAS

Tabela 1. Código da População (POP), estados (UF), município, localidade, coordenadas geográficas, número amostral (N) e comprovante de espécimes coletados nas seis populações amostradas do complexo de espécies *Cryptanthus pickelii* (Voucher).

| POP | Espécie | UF | Município | Localidade | Coordenadas | N (mol/mof) | Voucher - UFP |
|------|------------------------|----|----------------------|------------------------------|-------------------------|-------------|---------------|
| SLM* | <i>C. pickelii</i> | PE | São Lourenço da Mata | Reserva Ecológica Tapacurá | 08°04'00"S, 35°14'00"W | 20 - 14 | ALM 01 - 14 |
| ALD | <i>C. pickelii</i> | PE | Aldeia | Mata do Torquato Castro | 07°56'38"S, 35°02'09"W | 20 - 11 | ALM 15 - 25 |
| PAR* | <i>C. alagoanus</i> | AL | Paripueira | RPPN Sabiá | 09°26'17"S, 35°36'07"W | 20 - 18 | ALM 26 - 43 |
| MAM | <i>C. alagoanus</i> | PB | Mamanguape | Estação Ecológica Pau Brasil | 06°36'16"S, 35°07'45"W | 20 - 10 | ALM 44 - 53 |
| IPO | <i>C. alagoanus</i> | PE | Ipojuca | Mata do Cupe | 08°26'28" S, 34°59'33"W | 20 - 16 | ALM 54 - 69 |
| PIR* | <i>C. pirambuensis</i> | SE | Pirambu | Mata de Sambaíba | 10°39'19"S, 36°51'53"W | 20 - 13 | ALM 67 - 82 |

POP - População: São Lourenço da Mata (SLM – *C. pickelii*), Aldeia (ALD – *C. pickelii*), Paripueira (PAR – *C. alagoanus*), Mamanguape (MAM – *C. alagoanus*), Ipojuca (IPO – *C. alagoanus*), Pirambu (PIR – *C. pirambuensis*). Estados: Alagoas (AL), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Sergipe (SE). Reserva Permanente de Proteção Ambiental (RPPN). Número amostral de indivíduos incluídos nas análises moleculares e morfométricas, separados por / (N mol/mof), com um total de 120 indivíduos para análise molecular e 82 para morfometria. Os vouchers foram depositados no Herbário UFP. *Indica a população tipo.

Tabela 2. Comparação de caracteres diagnósticos e distribuição geográfica que diferencia *Cryptanthus pickelii*, *C. alagoanus* e *C. pirambuensis*.

| Caracteres diagnósticos e distribuição geográfica | <i>C. pickelii</i> | <i>C. alagoanus</i> | <i>C. pirambuensis</i> |
|---|--------------------|----------------------|------------------------|
| Propagação vegetativa | Gema axilar | Rizoma | Rizoma |
| Comprimento das folhas | 25-50 cm | 50-60 cm | 21,8–70,1 cm |
| Largura das folhas | 2-4 cm | 3,2-5 cm | 0,9–3,4 cm |
| Número de flores na inflorescência (apical) | 5-11 | ca. 8 | 17-23 |
| Número de flores na inflorescência (lateral) | 3-6 | 5-6 | 9-10 |
| Comprimento das sépalas | 0,5 cm | 0,9 cm | 1,36-1.8 |
| Largura das sépalas | 0,35 cm | 0,5 cm | -- |
| Habitat | Brejo de altitude | Restinga | Restinga |
| Distribuição geográfica | Pernambuco | Paraíba e Pernambuco | Sergipe |

Fonte: Leme & Siqueira-Filho (2001; 2007); Ferreira & Louzada (2022).

Tabela 3. Medidas morfométricas de indivíduos de seis populações do complexo *Cryptanthus pickelli*. Centímetro (cm), média (\bar{x}), desvio padrão (DS), mínimo (min) e máximo (max) para os espécimes examinados das populações de Aldeia (ALD), Ipojuca (IPO), Mamanguape (MAM), Paripueira (PAR), Pirambu (PIR) e São Lourenço da Mata (SLM).

| | População | | | | | |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| | ALD | IPO | MAM | PAR | PIR | SLM |
| Medidas | $\bar{x} \pm \text{SD}$ (cm) (min-max) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ (cm) (min-max) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ (cm) (min-max) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ (cm) (min-max) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ (cm) (min-max) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ (cm) (min-max) |
| Caracteres | N= 11 | N= 16 | N= 10 | N= 18 | N= 13 | N= 14 |
| CFME | 12.68 \pm 3.63 (8.87-18.96) | 17.92 \pm 3.96 (10.71-26.16) | 25.56 \pm 5.35 (17.21-33.85) | 25.14 \pm 6.39 (16.79-38.35) | 21.80 \pm 3.10 (13.44-25.60) | 14.56 \pm 3.90 (7.5-19.85) |
| CFMA | 38.99 \pm 11.59 (27.9-55.26) | 39.60 \pm 5.32 (31.11-49.19) | 57.23 \pm 8.84 (43.65-70.16) | 41.59 \pm 8.98 (23.74-56.84) | 35.60 \pm 6.30 (24.66-48.97) | 32.12 \pm 6.78 (20.81-41.57) |
| LFME | 1.36 \pm 0.40 (0.69-2.11) | 3.33 \pm 0.50 (2.70-4.47) | 2.60 \pm 0.43 (1.64-3.25) | 2.49 \pm 0.66 (1.77-4.25) | 2.34 \pm 0.42 (1.20-3.22) | 2.29 \pm 0.68 (1.21-3.41) |
| LFMA | 2.05 \pm 0.46 (1.45-2.81) | 3.68 \pm 0.39 (2.98-4.35) | 2.50 \pm 0.49 (1.79-3.42) | 3.30 \pm 0.81 (1.92-4.66) | 4.55 \pm 0.32 (4.23-5.04) | 3.13 \pm 0.79 (1.89-4.19) |
| CBME | 2.03 \pm 0.59 (1.13-3.14) | 2.62 \pm 0.38 (2.04-3.50) | 3.21 \pm 0.46 (2.49-3.85) | 2.92 \pm 0.42 (2.18-3.92) | 2.90 \pm 0.33 (2.04-3.61) | 1.96 \pm 0.46 (1.29-2.74) |
| CBMA | 2.36 \pm 0.54 (1.85-3.34) | 2.94 \pm 0.30 (2.2-3.47) | 2.97 \pm 0.44 (2.52-3.88) | 2.65 \pm 0.59 (1.78-3.84) | 2.74 \pm 0.45 (2.17-3.50) | 2.11 \pm 0.30 (1.69-2.81) |
| LBME | 1.49 \pm 0.44 (0.79-1.98) | 2.17 \pm 0.34 (1.78-2.92) | 3.07 \pm 0.45 (2.48-3.92) | 2.02 \pm 0.47 (1.14-2.85) | 2.16 \pm 0.45 (1.71-3.27) | 2.02 \pm 0.64 (1.06-3.21) |
| LBMA | 1.06 \pm 0.26 (0.80-1.75) | 2.13 \pm 0.33 (1.7-2.97) | 1.34 \pm 0.27 (0.91-1.71) | 1.79 \pm 0.50 (0.96-2.79) | 2.05 \pm 0.42 (1.47-2.98) | 1.11 \pm 0.21 (0.77-1.49) |
| LAME | 0.40 \pm 0.06 (0.30-0.50) | 1.09 \pm 0.16 (0.55-1.28) | 0.41 \pm 0.06 (0.31-0.49) | 0.78 \pm 0.22 (0.26-1.19) | 0.38 \pm 0.13 (0.21-0.60) | 0.38 \pm 0.15 (0.11-0.65) |
| LAMA | 0.43 \pm 0.06 (0.32-0.53) | 1.28 \pm 0.30 (0.57-1.89) | 0.47 \pm 0.09 (0.28-0.64) | 0.98 \pm 0.19 (0.68-1.38) | 0.32 \pm 0.08 (0.20-0.48) | 0.49 \pm 0.16 (0.22-0.76) |
| CBFME | 1.49 \pm 0.08 (1.38-1.60) | 2.17 \pm 0.55 (1.54-3.10) | 2.46 \pm 0.29 (1.89-2.85) | 2.62 \pm 0.22 (1.99-2.90) | 1.85 \pm 0.05 (1.78-1.92) | 2.20 \pm 0.60 (1.48-3.10) |
| CBFMA | 1.87 \pm 0.15 (1.48-1.98) | 2.55 \pm 0.62 (1.74-4.24) | 3.09 \pm 0.29 (2.59-3.48) | 3.15 \pm 0.19 (2.80-3.41) | 5.16 \pm 0.07 (4.98-5.25) | 2.53 \pm 0.69 (1.87-4.24) |
| LBFME | 0.69 \pm 0.05 (0.62-0.76) | 0.48 \pm 0.22 (0.33-1.27) | 0.60 \pm 0.12 (0.38-0.75) | 0.63 \pm 0.09 (0.45-0.76) | 0.42 \pm 0.07 (0.35-0.58) | 0.63 \pm 0.10 (0.47-0.78) |
| LBFMA | 0.96 \pm 0.17 (0.79-1.23) | 0.92 \pm 0.37 (0.40-2.10) | 0.89 \pm 0.16 (0.75-1.22) | 0.87 \pm 0.12 (0.76-1.22) | 2.06 \pm 0.07 (2.00-2.25) | 0.87 \pm 0.12 (0.68-1.02) |
| CFLME | 1.92 \pm 0.11 (1.79-2.12) | 3.94 \pm 0.56 (2.38-4.60) | 2.90 \pm 0.34 (2.48-3.45) | 3.16 \pm 0.57 (2.50-4.56) | 5.09 \pm 0.32 (4.40-5.49) | 1.85 \pm 0.11 (1.71-2.12) |
| CFLMA | 2.39 \pm 0.41 (2.04-2.99) | 4.40 \pm 0.34 (3.54-4.77) | 4.12 \pm 0.54 (3.72-5.55) | 5.11 \pm 0.70 (3.63-6.02) | 5.88 \pm 0.17 (5.45-6.01) | 2.87 \pm 0.24 (2.14-3.16) |
| LFLME | 0.34 \pm 0.03 (0.29-0.39) | 0.43 \pm 0.11 (0.27-0.62) | 0.27 \pm 0.07 (0.14-0.36) | 0.28 \pm 0.06 (0.14-0.38) | 0.31 \pm 0.06 (0.21-0.39) | 0.35 \pm 0.03 (0.29-0.39) |
| LFLMA | 0.42 \pm 0.02 (0.38-0.48) | 0.55 \pm 0.14 (0.34-0.80) | 0.40 \pm 0.03 (0.34-0.46) | 0.41 \pm 0.02 (0.35-0.46) | 0.62 \pm 0.08 (0.48-0.73) | 0.41 \pm 0.02 (0.38-0.48) |
| CSME | 0.51 \pm 0.02 (0.47-0.57) | 0.89 \pm 0.05 (0.79-0.99) | 0.93 \pm 0.06 (0.85-1.02) | 0.87 \pm 0.10 (0.76-1.08) | 1.17 \pm 0.12 (0.97-1.32) | 0.53 \pm 0.05 (0.47-0.67) |
| CSMA | 0.61 \pm 0.04 (0.55-0.68) | 0.97 \pm 0.05 (0.87-1.06) | 1.02 \pm 0.05 (0.98-1.13) | 1.13 \pm 0.11 (0.92-1.30) | 1.34 \pm 0.19 (1.12-1.90) | 0.63 \pm 0.04 (0.58-0.72) |
| CPME | 1.78 \pm 0.39 (1.28-1.55) | 3.05 \pm 0.52 (1.59-3.68) | 2.14 \pm 0.63 (1.59-3.74) | 2.34 \pm 0.60 (1.54-3.62) | 3.92 \pm 0.31 (3.15-4.25) | 1.32 \pm 0.06 (1.22-1.45) |
| CPMA | 1.78 \pm 0.39 (1.46-2.31) | 3.37 \pm 0.33 (2.67-3.75) | 3.09 \pm 0.54 (2.70-5.57) | 4.00 \pm 0.64 (2.64-4.77) | 4.57 \pm 0.10 (4.33-4.71) | 2.23 \pm 0.25 (1.46-2.49) |
| NFCA* | 9.36 \pm 0.67 (9-11) | 4.62 \pm 0.61 (4-6) | 7.70 \pm 0.94 (6-9) | 7.88 \pm 1.18 (6-10) | 10.61 \pm 1.38 (9-14) | 9.42 \pm 0.75 (9-11) |
| NFCL* | 6.45 \pm 0.52 (6-7) | 3.31 \pm 0.60 (2-4) | 6.00 \pm 0.66 (5-7) | 5.38 \pm 0.60 (4-6) | 7.46 \pm 1.19 (6-9) | 6.28 \pm 0.82 (5-7) |

Número de espécimes examinados (N). Caracteres: comprimento da folha menor (CFME), comprimento da folha maior (CFMA), largura da folha menor (LFME), largura da folha maior (LFMA), comprimento da base da folha menor (CBME), comprimento da folha maior (CBMA), largura da base da folha menor (LBFME), largura da base da folha maior (LBFMA), largura do ápice da folha menor (LAME), largura do ápice da folha maior (LAMA), comprimento da bainha da folha menor (CBFME), comprimento da bainha da folha maior (CBFMA), largura da bainha da folha menor (LBFME), largura da bainha da folha maior (LBFMA), comprimento da flor menor (CFLME), comprimento da flor maior (CFLMA), largura da flor menor (LFLME), largura da flor maior (LFLMA), comprimento da sépala menor (CSME), comprimento sépala maior (CSMA),

comprimento da pétala menor (CPME), comprimento da pétala maior (CPMA), número de flores na parte apical da inflorescência (NFCA) e número de flores na parte lateral da inflorescência (NFCL). *Indica medida de quantidade.

Tabela 4. Teste de Kruskal-Wallis para 24 caracteres morfológicos utilizados na análise morfométrica para indivíduos de seis populações do complexo de espécie *Cryptanthus pickelii* (Bromeliaceae).

| Caracteres | Chi-squared | p-value | Df |
|------------|-------------|-----------------------|----|
| CFME | 48.361 | 2.998e ⁻⁰⁹ | 5 |
| CFMA | 30.295 | 1.29e ⁻⁰⁵ | 5 |
| LFME | 35.685 | 1.098e ⁻⁰⁶ | 5 |
| LFMA | 51.909 | 5.631e ⁻¹⁰ | 5 |
| CBME | 40.158 | 1.388e ⁻⁰⁷ | 5 |
| CBMA | 25.392 | 0.000117 | 5 |
| LBME | 31.452 | 7.626e ⁻⁰⁶ | 5 |
| LBMA | 52.311 | 4.658e ⁻¹⁰ | 5 |
| LAME | 55.114 | 1.237e ⁻¹⁰ | 5 |
| LAMA | 64.553 | 1.387e ⁻¹² | 5 |
| CBFME | 41.746 | 6.63e ⁻⁰⁸ | 5 |
| CBFMA | 58.303 | 2.724e ⁻¹¹ | 5 |
| LBFME | 39.95 | 1.529e ⁻⁰⁷ | 5 |
| LBFMA | 33.456 | 3.059e ⁻⁰⁶ | 5 |
| CFLME | 70.632 | 7.568e ⁻¹⁴ | 5 |
| CFLMA | 68.419 | 2.185e ⁻¹³ | 5 |
| LFLME | 24.882 | 0.0001468 | 5 |
| LFLMA | 46.205 | 8.25e ⁻⁰⁹ | 5 |
| CSME | 64.328 | 1.545e ⁻¹² | 5 |
| CSMA | 68.332 | 2.278e ⁻¹³ | 5 |
| CPME | 68.706 | 1.904e ⁻¹³ | 5 |
| CPMA | 67.695 | 3.091e ⁻¹³ | 5 |
| NFCA | 63.375 | 2.434e ⁻¹² | 5 |
| NFCL | 57.942 | 3.233e ⁻¹¹ | 5 |

Caracteres analisados: comprimento da folha menor (CFME), comprimento da folha maior (CFMA), largura da folha menor (LFME), largura da folha maior (LFMA), comprimento da base da folha menor (CBME), comprimento da folha maior (CBMA), largura da base da folha menor (LBME), largura da base da folha maior (LBMA), largura do ápice da folha menor (LAME), largura do ápice da folha maior (LAMA), comprimento da bainha da folha menor (CBFME), comprimento da bainha da folha maior (CBFMA), largura da bainha da folha menor (LBFME), largura da bainha da folha maior (LBFMA), comprimento da flor menor (CFLME), comprimento da flor maior (CFLMA), largura da flor menor (LFLME), largura da flor maior (LFLMA), comprimento da sépala menor (CSME), comprimento sépala maior (CSMA), comprimento da pétala menor (CPME), comprimento da pétala maior (CPMA), número de flores na parte apical da inflorescência (NFCA) e número de flores na parte lateral da inflorescência (NFCL).

Tabela 5. Comparações pareadas usando o teste de Wilcoxon para os caracteres vegetativos de seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.

| Caracteres | População | ALD | IPO | MAM | PAR | PIR |
|------------|-----------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| CFME | IPO | 0.00754 | — | — | — | — |
| | MAM | 3.8e ⁻⁰⁵ | 0.00268 | — | — | — |
| | PAR | 6.1e ⁻⁰⁶ | 0.00076 | 0.79564 | — | — |
| | PIR | 3.8e ⁻⁰⁵ | 0.01049 | 0.12626 | 0.39982 | — |
| | SLM | 0.25668 | 0.06585 | 3.8e ⁻⁰⁵ | 8.7e ⁻⁰⁶ | 3.8e ⁻⁰⁵ |
| CFMA | IPO | 0.55800 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00236 | 0.00013 | — | — | — |
| | PAR | 0.55800 | 0.39623 | 0.00208 | — | — |
| | PIR | 0.90773 | 0.14192 | 0.000087 | 0.14807 | — |
| | SLM | 0.33368 | 0.00828 | 1.5e ⁻⁰⁵ | 0.00509 | 0.39623 |
| LFME | IPO | 0.0015 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.0041 | 0.0015 | — | — | — |
| | PAR | 0.0015 | 0.0013 | 0.2897 | — | — |
| | PIR | 0.0015 | 0.0015 | 0.2726 | 0.5343 | — |
| | SLM | 0.0132 | 0.0015 | 0.4207 | 0.4207 | 0.4207 |
| LFMA | IPO | 9.4e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.07002 | 0.00023 | — | — | — |
| | PAR | 0.00039 | 0.13797 | 0.01895 | — | — |
| | PIR | 0.00014 | 9.4e ⁻⁰⁵ | 0.00016 | 0.00014 | — |
| | SLM | 0.00186 | 0.07028 | 0.07028 | 0.54325 | 9.4e ⁻⁰⁵ |
| CBME | IPO | 0.00710 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00142 | 0.00799 | — | — | — |
| | PAR | 0.00238 | 0.0480 | 0.15811 | — | — |
| | PIR | 0.00799 | 0.03186 | 0.14211 | 100.000 | — |
| | SLM | 0.72992 | 0.00238 | 0.00019 | 0.00019 | 0.00019 |
| CBMA | IPO | 0.04999 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.09412 | 0.61635 | — | — | — |
| | PAR | 0.29543 | 0.17662 | 0.29543 | — | — |
| | PIR | 0.17584 | 0.29543 | 0.29543 | 0.61635 | — |
| | SLM | 0.47424 | 2,00e ⁻⁰⁵ | 0.00015 | 0.03284 | 0.00483 |
| LBME | IPO | 0.00107 | — | — | — | — |
| | MAM | 8.5e ⁻⁰⁵ | 0.00074 | — | — | — |
| | PAR | 0.06492 | 0.28467 | 0.00011 | — | — |
| | PIR | 0.00306 | 0.57745 | 0.00282 | 0.43203 | — |
| | SLM | 0.08645 | 0.45033 | .00282 | 0.84935 | 0.55553 |
| LBMA | IPO | 0.00011 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.04355 | 0.00013 | — | — | — |
| | PAR | 0.00044 | 0.02347 | 0.02347 | — | — |
| | PIR | 0.00031 | 0.70927 | 0.00068 | 0.17236 | — |
| | SLM | 0.39215 | 5.3e ⁻⁰⁵ | 0.04355 | 0.00036 | 0.00010 |
| LAME | IPO | 7.8e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.80467 | 8.8e ⁻⁰⁵ | — | — | — |
| | PAR | 0.00018 | 0.00037 | 0.00026 | — | — |
| | PIR | 0.78600 | 6.4e ⁻⁰⁵ | 0.78600 | 9.2e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.78600 | 6.4e ⁻⁰⁵ | 0.78600 | 8.8e ⁻⁰⁵ | 0.92265 |

| | | | | | | |
|------|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| LAMA | IPO | $3.8e^{-05}$ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.4078 | $6.5e^{-05}$ | — | — | — |
| | PAR | $2.8e^{-05}$ | 0.0013 | $3.8e^{-05}$ | — | — |
| | PIR | 0.0048 | $2.8e^{-05}$ | 0.0048 | $2.8e^{-05}$ | — |
| | SLM | 0.4078 | $2.8e^{-05}$ | 0.7033 | $2.8e^{-05}$ | 0.0048 |

População: ALD –Aldeia; IPO – Ipojuca; MAM – Mamanguape; PAR – Paripueira; PIR –Pirambu; SLM – São Lourenço da mata. Caracteres: CFME – Comprimento da folha menor; CFMA – Comprimento da folha maior; LFME – Largura da folha menor; LFMA – Largura da folha maior; CBME - Comprimento da base da folha menor; CBMA - Comprimento da base da folha maior; LBME – Largura da base da folha menor; LBMA - Largura da folha maior; LAME – Largura do ápice menor; LAMA – Largura do ápice maior. ALD – População de Aldeia; IPO – População de Ipojuca; MAM – População de Mamanguape; PAR – População de Paripueira; PIR – População de Pirambu; SLM – População de São Lourenço da mata.

Tabela 6. Comparações pareadas usando o teste de Wilcoxon para os caracteres reprodutivos de seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.

| Caracteres | População | ALD | IPO | MAM | PAR | PIR |
|------------|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| CBFME | IPO | 0.00029 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00036 | 0.16285 | — | — | — |
| | PAR | 7.0e ⁻⁰⁵ | 0.03699 | 0.16285 | — | — |
| | PIR | 0.00019 | 0.28146 | 0.00043 | 4.5e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.00117 | 0.98335 | 0.26515 | 0.09983 | 0.26515 |
| CBFMA | IPO | 0.00082 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00026 | 0.01047 | — | — | — |
| | PAR | 4.1e ⁻⁰⁵ | 0.00082 | 0.71863 | — | — |
| | PIR | 0.00011 | 4.1e ⁻⁰⁵ | 0.00016 | 4.1e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.00528 | 0.67739 | 0.02197 | 0.00141 | 4.1e ⁻⁰⁵ |
| LBFME | IPO | 0.00059 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.12926 | 0.01806 | — | — | — |
| | PAR | 0.15699 | 0.00098 | 0.76161 | — | — |
| | PIR | 0.00025 | 0.96965 | 0.00490 | 0.00025 | — |
| | SLM | 0.18861 | 0.00127 | 0.76161 | 0.96965 | 0.00025 |
| LBFMA | IPO | 0.84732 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.27462 | 0.84732 | — | — | — |
| | PAR | 0.24971 | 0.77943 | 0.98477 | — | — |
| | PIR | 0.00014 | 0.00014 | 0.00018 | 4.5e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.30282 | 0.98477 | 0.98477 | 0.98477 | 8.1e ⁻⁰⁵ |
| CFLME | IPO | 3.3e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00017 | 0.00047 | — | — | — |
| | PAR | 2.9e ⁻⁰⁵ | 0.00162 | 0.26888 | — | — |
| | PIR | 7.2e ⁻⁰⁵ | 2.9e ⁻⁰⁵ | 9.4e ⁻⁰⁵ | 1.8e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.11855 | 1.8e ⁻⁰⁵ | 7.5e ⁻⁰⁵ | 1.8e ⁻⁰⁵ | 2.9e ⁻⁰⁵ |
| CFLMA | IPO | 3.8e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00018 | 0.02007 | — | — | — |
| | PAR | 3.3e ⁻⁰⁵ | 0.00228 | 0.00528 | — | — |
| | PIR | 8.0e ⁻⁰⁵ | 2.7e ⁻⁰⁵ | 0.00013 | 0.00235 | — |
| | SLM | 0.01063 | 2.6e ⁻⁰⁵ | 8.8e ⁻⁰⁵ | 2.6e ⁻⁰⁵ | 3.3e ⁻⁰⁵ |
| LFLME | IPO | 0.1177 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.0420 | 0.0089 | — | — | — |
| | PAR | 0.0443 | 0.0083 | 0.5859 | — | — |
| | PIR | 0.1748 | 0.0215 | 0.2017 | 0.4347 | — |
| | SLM | 0.9767 | 0.0860 | 0.0234 | 0.0234 | 0.1575 |
| LFLMA | IPO | 0.00132 | — | — | — | — |
| | MAM | 0.32089 | 0.00096 | — | — | — |
| | PAR | 0.80768 | 0.00030 | 0.47974 | — | — |
| | PIR | 0.00021 | 0.13136 | 0.00023 | 4.4e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.85683 | 0.00062 | 0.33037 | 0.92322 | 9.0e ⁻⁰⁵ |
| CSME | IPO | 3.8e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00018 | 0.14413 | — | — | — |
| | PAR | 3.4e ⁻⁰⁵ | 0.38471 | 0.11452 | — | — |
| | PIR | 7.8e ⁻⁰⁵ | 3.4e ⁻⁰⁵ | 0.00168 | 7.8e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.48855 | 2.6e ⁻⁰⁵ | 7.8e ⁻⁰⁵ | 2.6e ⁻⁰⁵ | 3.4e ⁻⁰⁵ |

| | | | | | | |
|------|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| CSMA | IPO | 3.8e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00018 | 0.05353 | — | — | — |
| | PAR | 3.3e ⁻⁰⁵ | 0.00093 | 0.06528 | — | — |
| | PIR | 8.0e ⁻⁰⁵ | 2.7e ⁻⁰⁵ | 0.00017 | 0.00022 | — |
| | SLM | 0.16093 | 2.6e ⁻⁰⁵ | 8.5e ⁻⁰⁵ | 2.6e ⁻⁰⁵ | 3.3e ⁻⁰⁵ |
| CPME | IPO | 3.9e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00018 | 0.00509 | — | — | — |
| | PAR | 3.5e ⁻⁰⁵ | 0.00228 | 0.34961 | — | — |
| | PIR | 7.3e ⁻⁰⁵ | 7.3e ⁻⁰⁵ | 0.00018 | 2.5e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.0263 | 2.5e ⁻⁰⁵ | 7.8e ⁻⁰⁵ | 2.5e ⁻⁰⁵ | 3.5e ⁻⁰⁵ |
| CPMA | IPO | 3.8e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.0002 | 0.0287 | — | — | — |
| | PAR | 3.3e ⁻⁰⁵ | 3.3e ⁻⁰⁵ | 0.0071 | — | — |
| | PIR | 8.2e ⁻⁰⁵ | 2.8e ⁻⁰⁵ | 0.0002 | 0.0041 | — |
| | SLM | 0.0135 | 2.6e ⁻⁰⁵ | 8.7e ⁻⁰⁵ | 2.6e ⁻⁰⁵ | 3.3e ⁻⁰⁵ |
| NFCA | IPO | 2.9e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.00074 | 5.6e ⁻⁰⁵ | — | — | — |
| | PAR | 0.00192 | 8.8e ⁻⁰⁶ | 0.81949 | — | — |
| | PIR | 0.01199 | 1.8e ⁻⁰⁵ | 0.00023 | 7.3e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.97707 | 1.2e ⁻⁰⁵ | 0.00035 | 0.00074 | 0.01199 |
| NFCL | IPO | 3.0e ⁻⁰⁵ | — | — | — | — |
| | MAM | 0.13771 | 3.6e ⁻⁰⁵ | — | — | — |
| | PAR | 0.00062 | 8.8e ⁻⁰⁶ | 0.04036 | — | — |
| | PIR | 0.04036 | 1.7e ⁻⁰⁵ | 0.00628 | 3.6e ⁻⁰⁵ | — |
| | SLM | 0.76314 | 1.5e ⁻⁰⁵ | 0.35337 | 0.00628 | 0.02709 |

Populações: ALD – Aldeia; IPO – Ipojuca; MAM – Mamanguape; PAR – Paripueira; PIR – Pirambu; SLM – São Lourenço da mata. Caracteres: CBFME – Comprimento da bráctea floral menor; CBFMA – Comprimento da bráctea floral maior; LBFME – Largura da bráctea floral menor; LBFMA – Largura da bráctea floral maior; CFLME – Comprimento da flor menor; CFLMA – Comprimento da flor maior; LFLME – Largura da flor menor; LFLMA – Largura da flor maior; CSME – Comprimento da sépala menor; CSMA – Comprimento da sépala maior; CPME – Comprimento da pétala menor; CPMA – Comprimento da pétala maior, NFCA – Número de flores na parte apical da inflorescência; NFCL – Número de flores na parte lateral da inflorescência.

Tabela 7. Comparações pareadas usando análise de variância multivariada (MANOVAs) com 9999 permutações em uma matriz de distância sobre os caracteres analisados em seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.

| População | ALD | IPO | MAM | PAR | PIR |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| IPO | 0.00964 | – | – | – | – |
| MAM | 0.00050 | 0.00030 | – | – | – |
| PAR | 0.00164 | 0.00262 | 0.00075 | – | – |
| PIR | 0.00050 | 0.00030 | 0.00050 | 0.00854 | – |
| SLM | 0.07910 | 0.00030 | 0.00030 | 0.00050 | 0.00030 |

Populações: ALD (Aldeia); IPO (Ipojuca); MAM (Mamanguape); PAR (Paripueira); PIR (PIRAMBU) e SLM (São Lourenço da Mata).

Tabela 8. Caracterização de seis populações do Complexo *Cryptanthus pickelii* através de seis microssatélites nucleares, incluindo o tamanho das amostras (N), número de clones (NC), número de alelos (A), número de alelos privados (PA), riqueza alélica (AR), variância no tamanho do alelo (Var), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_E) e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}). Populações: Pirambu – Sergipe (PIR-SE); Paripueira – Alagoas (PAR-AL); São Lourenço da Mata – Pernambuco (SLM-PE); Ipojuca – Pernambuco (IPO-PE); Aldeia – Pernambuco (ALD-PE); Mamanguape – Paraíba (MAM-PB).

| Populações | N | NC | A | PA | AR | Var | H_o | H_E | F_{IS} |
|-------------|-----|----|------|-------|-------|--------|-------|-------|----------|
| PIR-SE | 20 | 3 | 17 | 1 | 2,799 | 20,225 | 0,369 | 0,495 | 0.260 |
| PAR-AL | 20 | 5 | 14 | 1 | 2,663 | 14,346 | 0,684 | 0,513 | -0.355* |
| SLM-PE | 20 | 9 | 17 | 1 | 2,833 | 9,078 | 0,657 | 0,498 | -0.352* |
| IPO-PE | 20 | 7 | 14 | 1 | 2,293 | 9,932 | 0,730 | 0,440 | -0.729* |
| ALD-PE | 20 | 1 | 19 | 0 | 2,863 | 37,904 | 0,506 | 0,446 | -0.233* |
| MAM-PB | 20 | 1 | 14 | 0 | 2,484 | 1,660 | 0,737 | 0,543 | -0.381* |
| Total/Média | 120 | 26 | 11,5 | 0,666 | 2,822 | 15,524 | 0,613 | 0,489 | -0,348 |

*Desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$, = 0.00139).

Tabela 9. Estimativa de fluxo gênico com base no número efetivo de migrantes (N_{em}) para pares de subpopulação do complexo *Cryptanthus pickelii*, estimado conforme Beerli & Felsenstein (1999) no *software* MIGRATE v.3.0.3.

| Par de subpopulação | 4Nm_21 | 4Nm_12 | N_{em_21} | N_{em_12} |
|---------------------|--------|-----------|--------------|--------------|
| PIR-SE1 / PAR-AL2 | 0.392 | 1.224 | 0.098 | 0.306 |
| PIR-SE1 / SLM-PE2 | 0.257 | 1.122 | 0.064 | 0.280 |
| PIR-SE1 / IPO-PE2 | 0.066 | 0.026 | 0.016 | 0.006 |
| PIR-SE1 / ALD-PE2 | 0.221 | 0.793 | 0.055 | 0.198 |
| PIR-SE1 / MAM-PB2 | 0.125 | 0.503 | 0.031 | 0.125 |
| PAR-AL1 / SLM-PE2 | 0.146 | 0.313 | 0.036 | 0.078 |
| PAR-AL1 / IPO-PE2 | 0.163 | 0.031 | 0.040 | 0.007 |
| PAR-AL1 / ALD-PE2 | 0.120 | 0.255 | 0.030 | 0.063 |
| PAR-AL1 / MAM-PB2 | 0.245 | 9.36e-014 | 0.061 | 2.34e-014 |
| SLM-PE1 / IPO-PE2 | 0.525 | 0.073 | 0.131 | 0.018 |
| SLM-PE1 / ALD-PE2 | 0.025 | 0.181 | 0.006 | 0.045 |
| SLM-PE1 / MAM-PB2 | 1.127 | 1.597 | 0.281 | 0.399 |
| IPO-PE1 / ALD-PE2 | 0.129 | 0.169 | 0.032 | 0.042 |
| IPO-PE1 / MAM-PB2 | 0.772 | 0.530 | 0.193 | 0.132 |
| ALD-PE1 / MAM-PB2 | 0.974 | 0.166 | 0.243 | 0.060 |

Populações: Pirambu – Sergipe (PIR-SE), Paripueira – Alagoas (PAR-AL), São Lourenço da Mata - Pernambuco (SLM-PE), Ipojuca – Pernambuco (IPO-PE), Aldeia – Pernambuco (ALD-PE), Mamanguape – Paraíba (MAM-PB).

Tabela 10. Análise de variância molecular (AMOVA) para microssatélites nucleares usados no complexo *Cryptanthus pickelii*.

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Componentes de variação | Porcentagem de variação | Estatística F | Valor de P |
|---|--------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|------------|
| Entre grupos - F_{CT} | 32.640 | 0.19707 | 11.87159 | 0.11872 | 0.03812 |
| Entre populações dentro dos grupos - F_{SC} | 27.403 | 0.40036 | 24.11725 | 0.27366 | 0.00000 |
| Dentro das populações - F_{ST} | 124.615 | 1.06262 | 64.01116 | 0.35989 | 0.00000 |
| Total | 184.658 | 1.66005 | 100.000 | - | - |

MATERIAL COMPLEMENTAR

Tabela 11. Valor de K estimado para 20 repetições em análise de estrutura genética de microssatélites nucleares para seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*, de acordo com o método proposto por Evanno *et al.* (2005).

| K | Reps | Mean LnP(K) | Stdev LnP(K) | Ln'(K) | Ln''(K) | Delta K |
|----|------|-------------|--------------|------------|-----------|-------------|
| 1 | 20 | -825.800000 | 0.472396 | — | — | — |
| 2 | 20 | -697.640000 | 1.008595 | 128.160000 | 41.375000 | 41.022427 |
| 3 | 20 | -60.855000 | 0.361976 | 86.785000 | 57.625000 | 159.195825* |
| 4 | 20 | -581.695000 | 2.242760 | 29.160000 | 2.105000 | 0.938576 |
| 5 | 20 | -550.430000 | 8.686778 | 31.265000 | 20.770000 | 2.390990 |
| 6 | 20 | -539.935000 | 3.779623 | 10.495000 | 43.425000 | 11.489240 |
| 7 | 20 | -572.865000 | 8.365108 | -32.930000 | 14.145000 | 1.690953 |
| 8 | 20 | -619.940000 | 35.354616 | -47.075000 | 23.955000 | 0.677564 |
| 9 | 20 | -690.970000 | 34.084324 | -71.030000 | 39.138095 | 1.148273 |
| 10 | 21 | -722.861905 | 46.060574 | -31.891905 | — | — |

Número de agrupamentos (K). Número de repetições realizadas para cada valor de K (Reps). *Indica melhor valor de K (K=3). Média dos valores de log-verossimilhança natural para cada valor de K (Mean LnP(K)). Desvio padrão dos valores de log-verossimilhança natural para cada valor de K (Stdev LnP(K)). Derivada do log-verossimilhança natural em relação a K (Ln'(K)). Valor absoluto da segunda derivada do log-verossimilhança natural em relação a K (Ln''(K)|). Valor do Delta K, calculado como a diferença entre os valores de Ln'(K) ponderados pelo desvio padrão Stdev LnP(K) (Delta K). *Indica melhor valor de K (K=3).

Tabela 12. Média das proporções dos grupos genéticos (coeficiente de membership) para as seis populações do complexo *Cryptanthus pickelii*.

| Populações | K1 | K2 | K3 |
|------------|-------|-------|-------|
| PIR-SE | 0.388 | 0.262 | 0.350 |
| PAR-AL | 0.395 | 0.255 | 0.350 |
| SLM-PE | 0.348 | 0.301 | 0.258 |
| IPO-PE | 0.397 | 0.301 | 0.300 |
| ALD-PE | 0.343 | 0.340 | 0.316 |
| MAM-PE | 0.212 | 0.438 | 0.348 |

Populações: Pirambu - Sergipe (PIR-SE); Paripueira - Alagoas (PAR-AL); São Lourenço da Mata - Pernambuco (SLM-PE); Ipojuca - Pernambuco (IPO-PE); Mamanguape - Paraíba (MAM-PB).

CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou a eficiência da amplificação cruzada dos marcadores microssatélites nucleares (SSR) desenvolvidos originalmente para outras espécies de Bromeliaceae e testadas no complexo *Cryptanthus pickelii*.
- As variáveis vegetativas e reprodutivas selecionadas neste trabalho foram úteis para identificar as similaridades e diferenças entre as populações amostradas.
- A análise multivariada indicou quatro morfotipos distintos, apresentando descontinuidades entre as populações que eram consideradas como *Cryptanthus alagoanus*.
- A estrutura genética do complexo foi dividida em três agrupamentos mais prováveis.
- Os resultados obtidos confirmam que *Cryptanthus alagoanus* e *C. pirambuensis* são sinônimos, representando uma mesma espécie.
- Este estudo apresentou o primeiro registro de ocorrência de *C. pickelii* no estado da Paraíba.
- Foi observado que a população de Ipojuca, em Pernambuco, está em processo de especiação híbrida com *C. zonatus*.
- Com base nessas descobertas, é recomendado que medidas sejam tomadas para garantir a conservação dessas espécies. Isso inclui a implementação de uma fiscalização efetiva nas unidades de conservação já existentes, bem como a implantação de duas unidades de conservação na população de Ipojuca - Pernambuco, e na população de Pirambu - Sergipe.

ANEXOS

Normas para publicação no *Brazilian Journal of Botany* disponível em:

<https://www.springer.com/journal/40415/submission-guidelines#Instructions%20for%20Authors>

Instructions for Authors

Article types

Cover letter is mandatory for all articles types.

Original articles should not exceed 30 doubled-spaced pages, including tables, figures, and references. Longer articles might be considered, provided they are concise and its length is needed to properly convey its results. The sections of original articles should be:

- Abstract
- Introduction
- Material and methods
- Results
- Discussion
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- References

Short Communications are handled rather flexible. The average article in this category has 4-6 printed pages (including references) and the "Results" and "Discussion" section are usually combined.

Reviews should be submitted by invitation only. Reviews should not exceed 15,000 words, 150 references and 15 visual elements (figures, tables, diagrams etc).

Normas para publicação no *Botanical Journal of the Linnean Society* disponível em:

https://academic.oup.com/botlinnean/pages/General_Instructions

Author Guidelines

Introduction

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

Submission

All manuscripts are submitted and reviewed via ScholarOne. To submit to the journal, go to the [online submission website](#). New authors should create an account prior to submitting a manuscript for consideration. Questions about submitting to the journal should be sent to the editorial office at botjlinnsoc@linnean.org.

Peer review process

All submissions to the journal are initially reviewed by one of the Editors. At this stage manuscripts may be rejected without peer review if it is felt that they are not of high enough priority or not relevant to the journal. This fast rejection process means that authors are given a quick decision and do not need to wait for the review process.

Manuscripts that are not instantly rejected are sent out for peer review, usually to two independent reviewers. Based on the feedback from these reviewers and the Editors' judgment a decision is given on the manuscript. The average time from submission to first decision is c. nine weeks.

If a paper is not acceptable in its present form, we will pass on suggestions for revisions to the author. For information on the journal's review process or a manuscript's progress, please contact the Managing Editor at botjlinnsoc@linnean.org.