
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JULIANA RIBEIRO MARTINS SANTIN

**FILOGEOGRAFIA E DIVERSIFICAÇÃO DE
LINHAGENS DO COMPLEXO *Pitcairnia*
flammea (BROMELIACEAE)**



Rio Claro
2018

JULIANA RIBEIRO MARTINS SANTIN

FILOGEOGRAFIA E DIVERSIFICAÇÃO DE LINHAGENS DO
COMPLEXO *Pitcairnia flammea* (BROMELIACEAE)

Orientadora: CLARISSE PALMA DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2018

S235f Santin, Juliana Ribeiro Martins
Filogeografia e diversificação de linhagens do complexo *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae) / Juliana Ribeiro Martins Santin. -- Rio Claro, 2018
32 p. : il., tabs., fotos, mapas + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Clarisse Palma da Silva

1. Ecologia Molecular. 2. Afloramentos rochosos. 3. Filogeografia. 4. Bromeliaceae. 5. Inselberg. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre acreditarem no meu potencial e me darem todo o suporte que eu precisei para realizar meus objetivos.

À minha orientadora, por ter me proporcionado inúmeras oportunidades de aprendizado e crescimento durante todos esses anos e por acreditar em segundas chances.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Molecular, por terem paciência comigo e sempre estarem dispostos a me ajudar, contribuindo para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e família de Rio Claro, por nunca me deixarem desistir e por estarem ao meu lado me dando forças nos momentos em que eu mais precisei e compartilhando risadas nos momentos felizes.

Aos meus amigos de Socorro, por terem feito parte importante do meu crescimento pessoal e por terem permanecido junto de mim, apesar da distância.

RESUMO

Estudos de filogeografia têm revelado os mecanismos de diversificação de diversos organismos, e podem contribuir muito para o avanço do conhecimento destes processos em grupos Neotropicais. Espécies de bromélias adaptadas a afloramentos rochosos Neotropicais tem despertado o interesse da comunidade científica por representarem casos extremos que auxiliam na compreensão do papel do fluxo gênico na coesão de espécies e especiação em ambientes naturalmente isolados. Os objetivos deste trabalho são: estudar a diversificação de linhagens e os padrões filogeográficos de *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae), uma espécie adaptada a afloramentos rochosos, inseridos no bioma Floresta Atlântica; avaliar a estrutura genética e o grau de isolamento entre as populações; investigar como a distribuição geográfica influencia a sua estrutura genética e contribuir para a conservação desta espécie e do bioma onde está inserida. Foram amplificados 10 loci de microssatélites nucleares para 20 populações de *Pitcairnia flammea*, localizadas ao longo da Floresta Atlântica, a fim de estimar os níveis de diversidade genética, com o cálculo de riqueza alélica, número de alelos, heterozigosidade esperada e observada e coeficiente de endogamia. Uma análise de variância molecular (AMOVA) foi feita para avaliar o padrão de diferenciação genética dentro e entre as populações. O número efetivo de migrantes (N_{em}) foi calculado para cada par de populações baseado no F_{ST} par a par. Para estimar a estrutura genética das populações foi utilizada uma análise Bayesiana a fim de calcular o número de grupos genéticos (K). Para detectar uma recente e pronunciada redução no tamanho efetivo da população (Bottleneck) foi utilizado o teste ‘Wilcoxon sign-rank’. Os níveis de diversidade genética em média foram moderados. O coeficiente de endogamia apresentou uma grande variação entre as populações, e em sua maioria, os valores foram positivos e significantes, com média de $F_{IS}=0.083$. Altos índices de diferenciação genética foram observados entre as populações, indicando que estas são altamente estruturadas e com baixo fluxo gênico entre si ($F_{ST}=0.384$, $P<0.0001$). O resultado da análise Bayesiana indicou a presença de 16 diferentes grupos genéticos ($K=16$). Os valores dos números efetivos de migrantes (N_{em}) foram muito baixos e com valores, em sua maioria, inferiores ao mínimo esperado para a manutenção da coesão de uma espécie. Não foram encontrados evidências de sinal de bottleneck em praticamente nenhuma das populações, sugerindo que não houve uma redução populacional recente para a maioria das populações. Pode-se concluir que há uma alta estruturação genética entre as populações, independente das variedades, reforçando a ideia de que estas populações estão evoluindo e diversificando há muito tempo, independente umas das outras. Além de apoiar o fato de que afloramentos rochosos são vistos como centros de diversidade de espécies e endemismo, por serem naturalmente isolados, contribuindo para a grande diversidade genética e morfológica observada atualmente nestas regiões.

Palavras-chaves: Filogeografia. Bromélias. Ecologia molecular. Especiação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivos específicos	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1	Material coletado e Extração de DNA	10
3.2	Amplificação e Genotipagem	11
3.3	Análise dos dados	11
3.3.1	<i>Diversidade genética</i>	11
3.3.2	<i>Estrutura genética</i>	11
4	RESULTADOS	13
4.1	Diversidade Genética	13
4.2	Estrutura populacional	14
5	DISCUSSÃO	21
5.1	Diversidade Genética	21
5.2	Estrutura genética e fluxo gênico	22
5.3	Conservação	24
6	CONCLUSÕES	26
7	REFERÊNCIAS	27
8	ANEXOS	32
8.1	Anexo A - Protocolo de amplificação em PCR de microssatélites nucleares	32

1 INTRODUÇÃO

O continente Sul Americano é composto por diversas regiões biogeográficas que contém os maiores índices de biodiversidade do planeta, e onde cinco hotspots de biodiversidade estão localizados. Entretanto, os padrões e processos responsáveis por moldar a diversidade de espécies na América do Sul são ainda mal compreendidos. Muito esforço tem sido empregado no sentido de entender a complexidade e os altos níveis de biodiversidade deste continente. Neste sentido, estudos filogeográficos de espécies Sul Americanas, podem disponibilizar importantes informações quanto aos processos históricos que foram responsáveis pela diversificação biológica nesta região. Análises moleculares baseadas no sequenciamento de DNA de espécies atuais, juntamente com os avanços na área da filogeografia estatística, têm promovido o entendimento de como eventos geológicos e as mudanças climáticas podem modificar a história demográfica das populações (AVISE, 2009). Sendo assim, estudos filogeográficos podem auxiliar no estudo da biodiversidade, modos de dispersão, tempos de diversificação, extinção, áreas de refúgio, além de outros processos ao nível populacional (microevolução – DINIZ-FILHO et al., 2008).

Apesar de as mudanças climáticas ocorridas durante o Pleistoceno não terem sido a única força promotora da diversificação neste continente (ex. HOORN et al., 2010; RULL, 2011, 2012; TURCHETTO-ZOLET et al., 2013), elas influenciaram de forma marcante a história demográfica e a distribuição geográfica de muitas espécies. Em um estudo de revisão, foram compilados dados de diversos estudos fitogeográficos de organismos Sul Americanos, e os padrões observados sugerem uma importante relação entre cenários demográficos e associação de organismos de ambientes florestais e de vegetação aberta. Na América do Sul, a distribuição geográfica de espécies associadas a ambientes florestais foram reduzidas principalmente durante os ciclos glaciais; por outro lado, espécies associadas a domínios de vegetação aberta tiveram respostas variáveis as flutuações climáticas (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013).

Na América do Sul, os estudos de filogeografia têm se tornado mais frequentes, e novos padrões biogeográficos vêm sendo revelados, especialmente em biomas brasileiros como a Floresta Atlântica. Historicamente, a Floresta Atlântica sofreu forte influência de oscilações climáticas originadas pelos períodos glaciais e interglaciais, que promoveram eventos de expansão e retração com subsequente fragmentação florestal (LEDRU et al.,

1996). O papel que estas flutuações climáticas históricas tiveram na modelagem dos padrões atuais de biodiversidade observados, tem sido esclarecido com os resultados obtidos por estudos filogeográficos. Os padrões de variação genética de populações atuais podem ser interpretados à luz de fatores demográficos, incluindo flutuações climáticas que ocorreram no passado, modificando o tamanho das populações e sua localização.

Neste contexto, um estudo de caso, demonstrou que as populações de *Vriesea gigantea*, uma bromélia epífita tipicamente associada a ambientes florestais, e endêmica da Floresta Atlântica Brasileira, sofreram expansão demográfica consistente com a expansão histórica da floresta do norte para o sul da distribuição atual da espécie (PALMA-SILVA et al., 2009). Os autores também relataram uma forte quebra filogeográfica entre os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (próximo à latitude 23°S), provavelmente refletindo um isolamento populacional histórico compatível com múltiplos refúgios durante as mudanças climáticas do Pleistoceno. Por outro lado, um crescente número de estudos têm demonstrado que espécies não associadas a ambientes florestais nem sempre sofreram uma dramática fragmentação de suas distribuições em diferentes refúgios durante a última glaciação (ca. 20.000 anos), como o observado para espécies florestais (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Este cenário sugere fortemente que uma significativa porção do conhecimento da história evolutiva de espécies não associadas a ambientes florestais tem sido amplamente negligenciado.

A Floresta Atlântica, no sul e sudeste do Brasil, é um complexo formado por várias comunidades vegetais, incluindo Florestas Pluviais Baixo Montanas, Florestas Pluviais de Altitude, Florestas Pluviais Ripária, Florestas Pluviais em Manchas e Florestas Paludosas Litorâneas (RIZZINI, 1979). Além dos ambientes florestais, este bioma também apresenta mosaicos de ambientes abertos (ex. restingas, afloramentos rochosos, campos de altitude) (SCARANO, 2009). Afloramentos rochosos, também chamados de inselbergs, são formações geológicas rodeadas por uma matriz florestal (POREMBSKI, 2007). Os afloramentos rochosos, especialmente os Neotropicais, são considerados ambientes de “ilhas terrestres” devido a sua estruturação espacial e isolamento ecológico, que causam uma forte barreira de dispersão e migração para as espécies que ali habitam. Estes ambientes constituem centros de endemismos e de alta diversidade de espécies, uma vez que possuem uma origem muito antiga (milhares de anos). Além disso, fatores climáticos e edáficos separam os afloramentos rochosos do restante da floresta que os circunda, o que explica a sua biota altamente especializada (POREMBSKI, 2007).

Espécies de bromélias adaptadas a afloramentos rochosos Neotropicais têm despertado o interesse da comunidade científica por representarem casos extremos que auxiliam na compreensão do papel do fluxo gênico na coesão de espécies e especiação em ambientes isolados (*Encholirium* – CAVALLARI et al., 2006; *Alcantarea* – Southeastern Brazil: BARBARÁ et al., 2007, 2009; *Pitcairnia* – French Guiana: SARTHOU et al., 2001 e BOISSELIER-DUBAYLE et al., 2010; *Pitcairnia* – Southeastern Brazil: PALMA-SILVA et al., 2011; *Fosterella* – WAGNER et al., 2012). Estes estudos revelaram extrema diferenciação populacional e ausência de isolamento-por-distância entre os inselbergs, indicando assim que os afloramentos rochosos podem ter semelhanças com as ilhas oceânicas como arenas para estudos evolutivos.

A família Bromeliaceae é composta por espécies Neotropicais que sofreram uma extensa radiação adaptativa. Bromeliaceae é uma família monofilética, e este padrão tem sido suportado por vários estudos filogenéticos (BENZING, 2000; GIVNISH, 2004, 2007; 2011; BARFUSS, 2005). O extenso potencial de radiação adaptativa da família se reflete na grande diversidade de suas espécies. Além disso, a circunscrição de gêneros e espécies muitas vezes falha em definir grupos naturais, sugerindo processos de especiação recente com espécies incipientes ainda não completamente definidas (FARIA et al., 2004). Bromeliaceae possui atualmente cerca de 3000 espécies, divididas em aproximadamente 56 gêneros (BENZING, 2000). O Brasil é o maior centro de diversidade de bromélias, onde podemos encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas. Em especial o leste brasileiro é um dos principais centros de diversidade de Bromélias e com inúmeros gêneros endêmicos (BENZING, 2000). Regiões com alta riqueza de espécies e altos níveis de endemismo oferecem excelentes oportunidades para a investigação de hipóteses sobre evolução do isolamento reprodutivo (VAN DER NIET et al., 2006; WENDT et al., 2008). As bromélias vêm sendo estudadas por pesquisadores interessados em microevolução e especiação na região Neotropical (e.g. SARTHOU et al., 2001; CAVALLARI et al., 2006; BARBARÁ et al., 2007, 2009; PALMA-SILVA et al., 2009, 2011; ZANELLA et al., 2011, 2012; WAGNER et al., 2012).

Pitcairnia flammea é uma espécie exclusivamente saxícola e endêmica de afloramentos rochosos graníticos e gnáissicos no sul e sudeste do Brasil (MARTINELLI et al., 2008). Esta espécie possui uma extensa variabilidade morfológica entre populações, principalmente nas estruturas vegetativas da planta, característica utilizada por diferentes autores para a descrição de várias sub-espécies: *P. flammea* var. *flammea*; *P. flammea* var. *glabrior* L.B. Smith; *P. flammea* var. *roezlii* (E. Morren) L.B. Smith; *P. flammea* var. *floccosa*; *P. flammea* var. *macropoda* L.B. Smith & Reitz; *P. flammea* var. *pallida* L.B. Smith)

(MARTINELLI et al. 2008). Além disso, a espécie *Pitcairnia corcovadensis* era considerada uma variedade de *P. flammea*, tendo sido restabelecida como uma espécie distinta por Wendt et al. (2000).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar a diversidade de linhagens e os padrões filogeográficos de uma espécie (*Pitcairnia flammea*) adaptada a afloramentos rochosos da Floresta Atlântica Brasileira.

2.1 Objetivos específicos

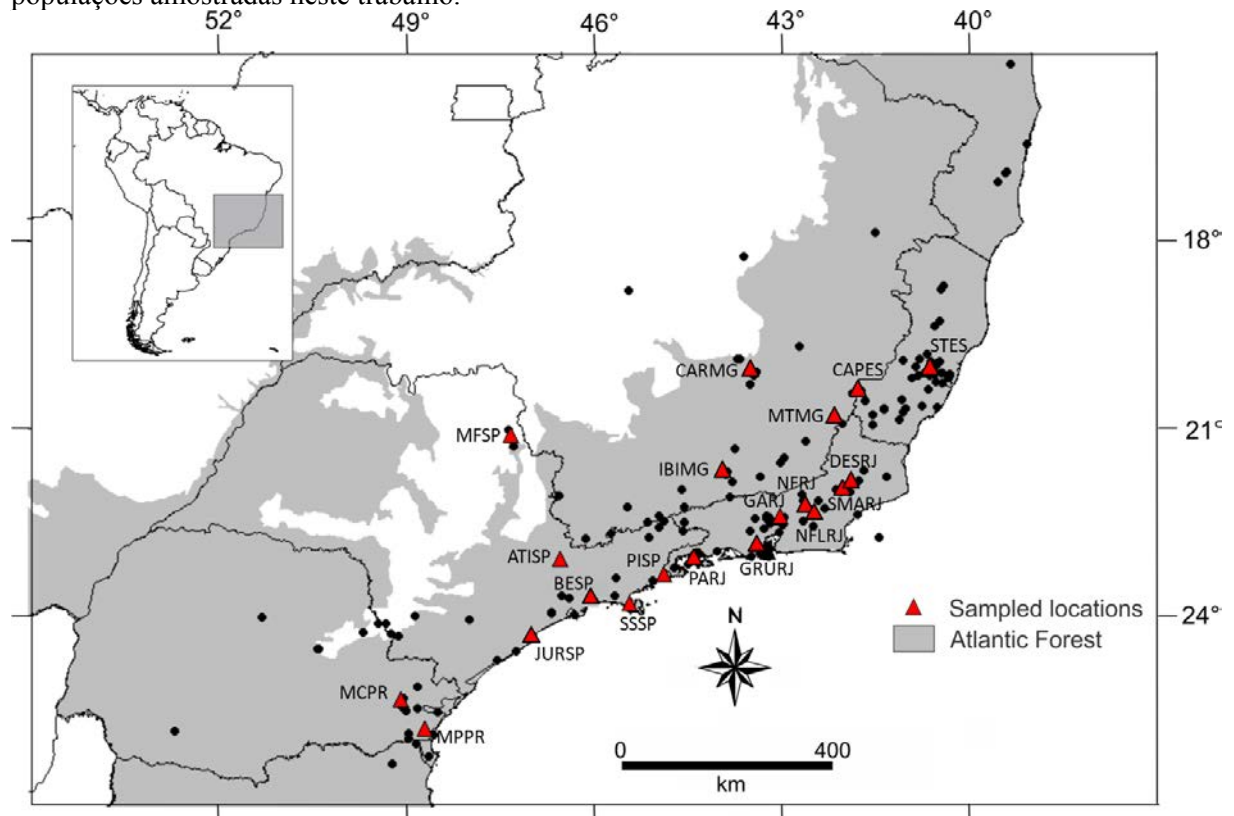
- Avaliar a estrutura genética e o grau de isolamento entre populações disjuntas de *P. flammea* de afloramentos rochosos da Floresta Atlântica.
- Investigar como a distribuição geográfica influencia a estrutura genética das espécies e populações, e os mecanismos envolvidos na diversificação do grupo, utilizando uma abordagem filogeográfica;
- Contribuir para a conservação destas espécies e do bioma onde elas estão inseridas (Floresta Atlântica), com a definição de áreas prioritárias para conservação, tendo como referência a estruturação genética das populações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material coletado e Extração de DNA

Foram utilizadas amostras de indivíduos de *Pitcairnia flammea* que foram coletadas ao longo de sua distribuição geográfica (Figura 1). No total, foram coletados cinco das seis variedades do complexo *P. flammea* e uma espécie morfológicamente semelhante: *P. carinata*, que foi inserida para testar o grau de diferenciação genética entre as populações de *P. flammea* (Tabela 1). Estas amostras são compostas por parte das folhas de cada indivíduo e foram armazenadas e desidratadas em sílica gel. A extração do DNA das amostras foi feita utilizando o Kit de extração de DNA “Dneasy 96 Plant Kit – Qiagen” seguindo as recomendações do fabricante.

Figura 1: Mapa da distribuição das populações ao longo da Floresta Atlântica. Os pontos pretos representam as áreas de ocorrência de *P. flammea* e os triângulos vermelhos representam as populações amostradas neste trabalho.



3.2 Amplificação e Genotipagem

Em todas as amostras, foram amplificados 10 loci de microssatélites nucleares previamente desenvolvidos para espécies de Bromeliaceae (AOKI-GONÇALVES et al., 2014; BONEH et al., 2003; PALMA-SILVA et al., 2011; PAGGI et al., 2008; WOHRMANN; WEISING, 2011; WOHRMANN et al., 2012) e otimizados para *P. flammea*. Foram utilizadas caudas M13 marcadas com diferentes fluorescências, permitindo a genotipagem em multiplex. Os protocolos de amplificação foram realizados conforme Palma-Silva et. al. (2007), com modificações (Anexo A). Os produtos de amplificação foram genotipados em sequenciador automático de DNA ABI 3500 (AppliedBiosystems), através do programa GENEMARKER v.1.95 (SoftGenetics, StateCollege, Pennsylvania, USA), através da análise manual dos alelos de cada indivíduo.

Tabela 1: Variedades de do complexo *P. flammea* coletadas

Variedade	Populações
<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	11
<i>P. flammea</i> var. <i>floccosa</i>	5
<i>P. flammea</i> var. <i>palida</i>	1
<i>P. flammea</i> var. <i>macropoda</i>	2
<i>P. flammea</i> var. <i>roeltzii</i>	1

3.3 Análise dos dados

3.3.1 Diversidade genética

Os níveis de diversidade genética foram descritos através do cálculo das seguintes estatísticas: riqueza alélica (A_r), número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) e coeficiente de endogamia (F_{IS}), calculados pelo programa MSANALYSER v.4.05 (DIERINGER; SCHLÖTTERER, 2003) e FSTAT v 2.9.3 (GOUDET, 2001). O programa GENEPOP versão 3.5 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) foi utilizado para testar os princípios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada população.

3.3.2 Estrutura genética

Para avaliar o padrão de diferenciação genética dentro e entre as populações, foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) através do programa ARLEQUIN

versão 3.5 (EXCOFFIER et al., 2010). Esta estatística estima a porcentagem de partição da variabilidade entre os grupos; fornece resultados dos cálculos dos três níveis hierárquicos de diferenciação populacional: entre grupos (F_{CT}), entre populações dentro de grupos (F_{ST}) e dentro das populações (F_{SC}) e ainda, calcula o coeficiente de endocruzamento específico (F_{IS}). Quando um grupo é definido, é possível obter um valor de F_{ST} específico do conjunto de dados, que permite avaliar o grau de diferenciação e estruturação das populações. Uma AMOVA hierárquica foi realizada entre as variedades do complexo *P. flammea*, considerando cada grupo, uma variedade diferente, para testar se existe maior diferenciação genética entre as variedades do que entre as populações dentro de cada variedade.

O número efetivo de migrantes (N_{em}) foi calculado para cada par de populações baseado no F_{ST} par a par obtido pelo programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012), através da fórmula $N_{em} = (1/F_{ST} - 1)/4$.

Para estimar a estrutura genética populacional das espécies será utilizada uma análise Bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), a fim de calcular o número de grupos genéticos (K). As análises foram realizadas assumindo frequências alélicas independentes e usando um período de “burn-in” de 250 000 corridas de 1 000 000 de comprimento e 10 repetições por K que variaram de 1 a 21. Para determinar o número mais provável de grupos genéticos (K) foi utilizado o método de Evanno et al. (2005) através do programa STRUCTURE-HARVESTER Web v0.6.94 (EARL; VON HOLDT, 2011).

Uma análise das coordenadas principais (PCoA) também foi realizada para visualizar a estrutura genética entre as populações, implementada pelo programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Para detectar uma recente e pronunciada redução no tamanho efetivo da população (efeito Bottleneck) foi utilizado o teste ‘Wilcoxon sign-rank’, através do software BOTTLENECK 1.2 (PIRYET al., 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Diversidade Genética

Foram analisadas 20 populações alopátricas de *Pitcairnia flammea*, totalizando 420 indivíduos, com uma média de 21 indivíduos por população (Tabela 2). A riqueza alélica teve uma variação de 1,24 a 5,37 (Tabela 3; Figura 2); o número médio de alelos variou de 1,5 a 8,4; a heterozigosidade esperada variou de 0,041 a 0,727 (Tabela 3; Figura 3) e a observada variou de 0,035 a 0,673 (Tabela 3). O coeficiente de endogamia apresentou um valor médio de $F_{IS}=0.083$ (Tabela 3), em geral, com valores positivos, com exceção das populações GRURJ e GARJ, e, significantes, com exceção de PISP, GRURJ, GARJ, CAPES e STES.

Tabela 2: Tabela das populações analisadas neste projeto, indicando o local onde foram coletadas.

População	Espécie / Variedade	Município	Localidade	Estado
MCPR	<i>P. flammea</i> var. <i>floccosa</i>	Campina Grande do Sul	Morro do Capivari	PR
ATISP	<i>P. flammea</i> var. <i>floccosa</i>	Atibaia	Pedra Grande	SP
BESP	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Mogi das Cruzes - Bertioga	Estrada Mogi-Bertioga	SP
PISP	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Picinguaba	Praia da Fazenda	SP
MPPR	<i>P. flammea</i> var. <i>floccosa</i>	Guaratuba	Morro dos perdidos	PR
SSSP	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	São Sebastião	Praia toque-toque	SP
MFSP	<i>P. flammea</i> var. <i>floccosa</i>	Altinópolis	Morro do Forno	SP
GRURJ	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Grajaú	Grajaú	RJ
GARJ	<i>P. flammea</i> var. <i>palida</i>	Teresópolis	Garrafão	RJ
JURSP	<i>P. flammea</i> var. <i>floccosa</i>	Peruíbe	Estação ecológica da Jureia	SP
PARJ	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Paraty	Pedra 1	RJ
IBIMG	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Ibitipoca	Cachoeira dos Macacos	MG
MTMG	<i>P. flammea</i> var. <i>macropoda</i>	Município de Tombos	Hidroelétrica	MG
CAPES	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Alto do Caparaó	Pedra Roxa	ES
NFRJ	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Nova Friburgo	Morro da Torre	RJ
NFLRJ	<i>P. flammea</i> var. <i>roeltzii</i>	Nova Friburgo	Estrada Leopoldina	RJ
SMARJ	<i>P. flammea</i> var. <i>macropoda</i>	Santa Maria Madalena	Cascata escorrega	RJ
CARMG	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Catas Altas	RPPN Santuário do Caraça	MG
DESRJ	<i>P. carinata</i>	Santa Maria Madalena	Desengano	RJ
STES	<i>P. flammea</i> var. <i>flammea</i>	Santa Teresa	Reserva Ecológica Santa Lucia	ES

Tabela 3: Diversidade genética amostrada em populações alopátricas de *Pitcairnia flammea*. N: número de indivíduos; A: número de alelos; Ar: riqueza alélica; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; F_{IS} : coeficiente de endocruzamento. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$ e * $P < 0.05$.

Populações	N	A	Ar	Ho	He	Fis
MCPR	23	6,7	4,81	0,495	0,598	0,253***
ATISP	22	5,5	4,17	0,521	0,619	0,193***
BESP	21	3,1	2,48	0,243	0,335	0,340***
PISP	22	3,5	2,84	0,425	0,453	0,079
MPPR	25	6,5	4,35	0,497	0,579	0,175***
SSSP	27	3,8	3,12	0,315	0,474	0,352***
MFSP	24	8,4	5,21	0,597	0,641	0,094**
GRURJ	8	3,0	2,98	0,486	0,448	-0,012
GARJ	12	5,0	4,32	0,673	0,616	-0,039
JURSP	28	5,1	3,69	0,341	0,593	0,422***
PARJ	22	5,4	4,19	0,431	0,644	0,380***
MTMG	20	7,5	5,37	0,657	0,714	0,111**
CAPES	22	1,5	1,24	0,035	0,041	0,226
NFRJ	21	6,6	5,00	0,471	0,727	0,372***
NFLRJ	20	3,4	2,65	0,313	0,349	0,117*
SMARJ	21	3,1	2,70	0,434	0,472	0,073*
CARMG	23	6,9	4,66	0,526	0,593	0,095***
DESRJ	20	6,3	4,48	0,528	0,667	0,231***
STES	19	4,3	3,38	0,490	0,507	0,162
IBIMG	20	3,6	2,82	0,375	0,427	0,192**
Média	21	5,0	3,72	0,443	0,525	0,0832

4.2 Estrutura populacional

A análise de variância molecular (AMOVA) apresentou um índice de diferenciação genética alto e significativo entre as populações $F_{ST}=0.384$, ($P<0.0001$) (Tabela 4).

Para a AMOVA hierárquica, considerando as diferentes variedades do complexo *P. flammea* (Tabela 1), o valor de diferenciação genética entre as variedades foi baixo e não significativo, com $F_{CT}=0.030$ ($P\text{-value}=0.1633$). Os valores de diferenciação genética entre as populações dentro de cada grupo (variedade) foi alto e significativo, com $F_{SC}=0.371$ ($P<0.0001$) (Tabela 5), com o índice de diferenciação entre todas as populações de $F_{ST}=0.390$ ($P<0.0001$).

As análises de F_{ST} par a par também apresentaram valores altos e significantes, variando de 0.104 a 0.833. Os valores dos números efetivos de migrantes calculados a partir dos resultados do F_{ST} par a par foram em média $N_{em} = 0.475$ (Tabela 6).

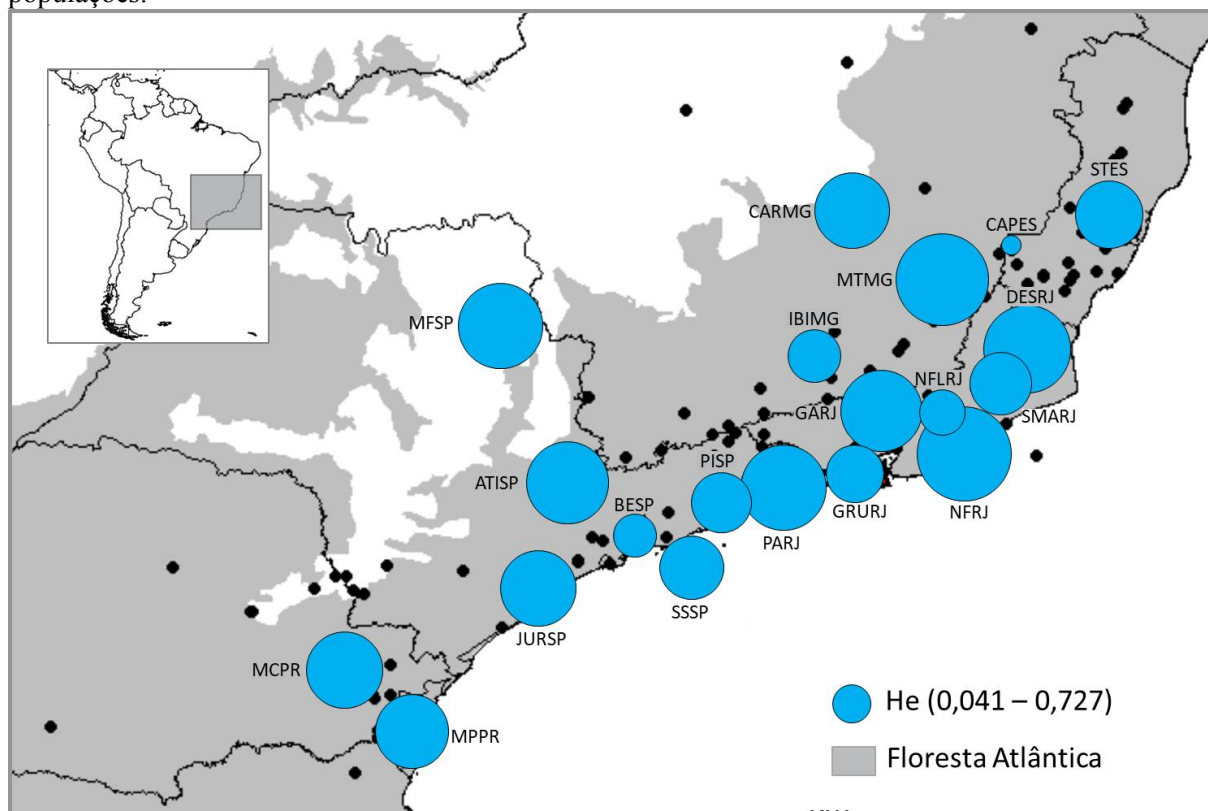
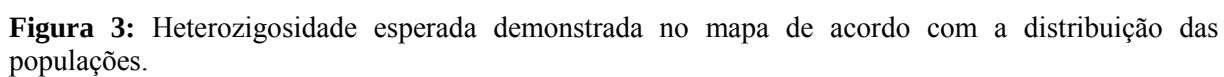


Figura 4: Coeficiente de endogamia demonstrada no mapa de acordo com a distribuição das populações.

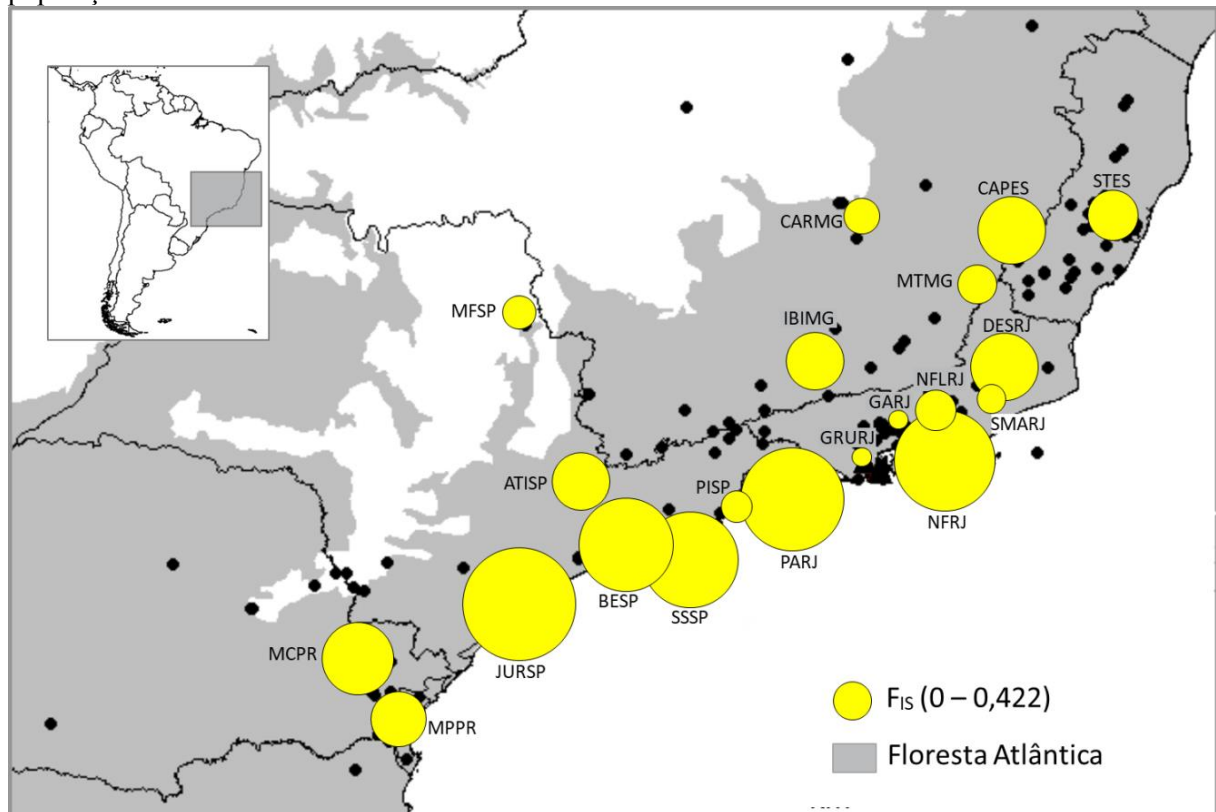


Tabela 4: Resultados da análise de variância molecular (AMOVA)

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Variation (%)	F-statistic	P-value
Among populations	19	666.279	0.80599	38.41	$F_{ST}=0.384$	0.0001
Within populations	820	1.059.881	129.254	61.59		
Total	839	1.726.160	209.853			

Tabela 5: Resultados da AMOVA hierárquica. Para cada grupo foi considerada uma variedade diferente do complexo *P. flammea*.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Variation (%)	F-statistic	P-value
Among variedades	5	189.039	0.06327	2.99	$F_{CT}=0.030$	0.1633
Among populations within variedades	14	477.240	0.76177	35.97	$F_{SC}=0.371$	0.0001
Within populations	820	1.059.881	129.254	61.04	$F_{ST}=0.390$	0.0001
Total	839	1.726.160	211.757			

O resultado da análise Bayesiana no programa STRUCTURE (Figura 5) indicou a presença de três possíveis valores de grupos genéticos ($K=2$, $K=10$ e $K=16$), de acordo com a metodologia ΔK proposta por Evanno et al. (2005). Analisando os valores de ΔK (Figura 6), o $K=2$ apresenta maior significância, porém não parece refletir um significado biológico, e,

portanto, optou-se por adotar o $K=16$ como resultado biologicamente mais provável seguindo a metodologia descrita por Pritchard et al. (2000), devido ao fato de as populações ocorrerem em ambientes naturalmente fragmentados e isolados. Considerando o $K=16$, algumas populações foram agrupadas em um mesmo grupo genético, refletindo a proximidade geográfica das populações, como é o caso de MCPR e MPPR, BESP e PISP e CAPES e IBIMG (Figura 9). A população de PARJ foi separada e cada sub-grupo foi agrupado com outras duas populações: GRURJ e SMARJ. A análise de coordenadas principais (PCoA) também tem como resultado a alta estruturação entre as populações (Figuras 7 e 8) e nenhuma relação com a existência de variedades como proposto por diversos autores.

Tabela 6: Diagonal inferior com os valores de F_{ST} par a par e diagonal superior com os valores de N_{em} .

	MCPR	ATISP	BESP	PISP	MPPR	SSSP	MFSP	GRURJ	GARJ	JURSP	PARJ	MTMG	CAPES	NFRJ	NFLRJ	SMARJ	CARMG	DES RJ	STES	IBIMG
MCPR	0	1.194	1.247	1.017	0.711	0.352	0.582	0.178	0.984	0.793	0.373	0.596	0.468	0.293	1.030	1.120	2.165	0.506	0.308	0.673
ATISP	0.173	0	0.668	1.058	0.629	0.387	0.553	0.204	1.208	0.685	0.459	0.562	0.547	0.313	1.020	0.987	1.119	0.308	0.305	0.722
BESP	0.167	0.272	0	0.774	0.589	0.246	0.399	0.134	0.747	0.609	0.257	0.482	0.325	0.263	0.609	0.635	0.992	0.327	0.242	0.472
PISP	0.197	0.191	0.244	0	0.608	0.279	0.425	0.155	0.765	0.766	0.307	0.667	0.375	0.242	0.645	0.839	1.086	0.381	0.284	0.599
MPPR	0.260	0.284	0.298	0.291	0	0.330	0.458	0.170	0.646	0.712	0.299	0.438	0.341	0.245	0.661	0.725	0.835	0.415	0.299	0.540
SSSP	0.415	0.393	0.504	0.473	0.431	0	0.224	0.229	0.390	0.275	0.228	0.202	0.302	0.157	0.423	0.290	0.351	0.258	0.272	0.313
MFSP	0.300	0.311	0.385	0.370	0.353	0.528	0	0.096	0.834	0.424	0.260	0.296	0.280	0.264	0.521	0.488	0.603	0.410	0.215	0.566
GRURJ	0.584	0.551	0.651	0.617	0.596	0.522	0.723	0	0.231	0.153	0.050	0.102	0.112	0.065	0.229	0.140	0.193	0.215	0.095	0.163
GARJ	0.203	0.171	0.251	0.246	0.279	0.391	0.231	0.520	0	0.634	0.597	0.561	0.532	0.505	0.916	0.916	1.140	0.749	0.393	1.130
JURSP	0.240	0.267	0.291	0.246	0.260	0.476	0.371	0.621	0.283	0	0.274	0.752	0.334	0.259	0.640	0.684	1.157	0.331	0.253	0.561
PARJ	0.401	0.352	0.493	0.448	0.456	0.524	0.490	0.833	0.295	0.477	0	0.195	0.259	0.174	0.559	0.298	0.424	0.286	0.194	0.437
MTMG	0.296	0.308	0.341	0.273	0.363	0.553	0.457	0.710	0.308	0.249	0.562	0	0.264	0.191	0.479	0.521	0.917	0.259	0.197	0.403
CAPES	0.348	0.314	0.434	0.400	0.423	0.453	0.472	0.690	0.320	0.428	0.492	0.486	0	0.385	0.551	0.357	0.472	0.368	0.180	0.372
NFRJ	0.460	0.444	0.487	0.508	0.505	0.615	0.486	0.794	0.331	0.491	0.590	0.567	0.394	0	0.322	0.245	0.341	0.281	0.148	0.352
NFLRJ	0.195	0.197	0.291	0.279	0.274	0.372	0.324	0.521	0.214	0.281	0.309	0.343	0.312	0.437	0	0.822	0.981	0.492	0.314	0.719
SMARJ	0.182	0.202	0.283	0.230	0.257	0.463	0.339	0.640	0.214	0.268	0.456	0.324	0.412	0.505	0.233	0	1.112	0.397	0.291	0.677
CARMG	0.104	0.183	0.201	0.187	0.230	0.416	0.293	0.564	0.180	0.178	0.371	0.214	0.346	0.423	0.203	0.184	0	0.552	0.383	0.810
DES RJ	0.330	0.351	0.433	0.396	0.376	0.492	0.379	0.688	0.250	0.430	0.466	0.491	0.405	0.471	0.337	0.386	0.312	0	0.246	0.535
STES	0.448	0.451	0.508	0.468	0.455	0.479	0.538	0.725	0.389	0.497	0.563	0.560	0.581	0.628	0.443	0.462	0.395	0.504	0	0.391
IBIMG	0.271	0.257	0.346	0.294	0.317	0.444	0.306	0.606	0.181	0.308	0.364	0.383	0.402	0.415	0.258	0.270	0.236	0.318	0.390	0

Não foram encontradas evidências de sinal de Bottleneck genético (Tabela 7) para praticamente nenhuma das populações (exceto para NFRJ e MTMG). Sugerindo que as populações não foram afetadas por reduções populacionais severas recentemente ou efeitos fundadores.

Tabela 7: Resultado do teste de probabilidade Bottleneck (IAM: Infinite Allele Model; TPM: Two-Phase Mutation Model). *Valor significativo para $P < 0.05$.

Populações	IAM	TPM
MCPR	0.722	0.903
ATISP	0.065	0.423
BESP	0.590	0.850
PISP	0.125	0.367
MPPR	0.385	0.839
SSSP	0.150	0.715
MFSP	0.125	0.850
GRURJ	0.385	0.615
GARJ	0.161	0.539
JURSP	0.116	0.385
PARJ	0.002	0.138
MTMG	0.001*	0.041*
CAPES	1.000	1.000
NFRJ	0.0001*	0.002*
NFLRJ	0.809	0.902
SMARJ	0.012*	0.161
CARMG	0.278	0.722
DESRJ	0.065	0.500
STES	0.500	0.862
IBIMG	0.098	0.422

Figura 5: Resultado do STRUCTURE mostrando as probabilidades de atribuição encontradas para $K=16$ em 20 populações alopátricas de *Pitcairnia flammea* analisadas com microssatélites nucleares (Structure limite Q-valor > 0.90).

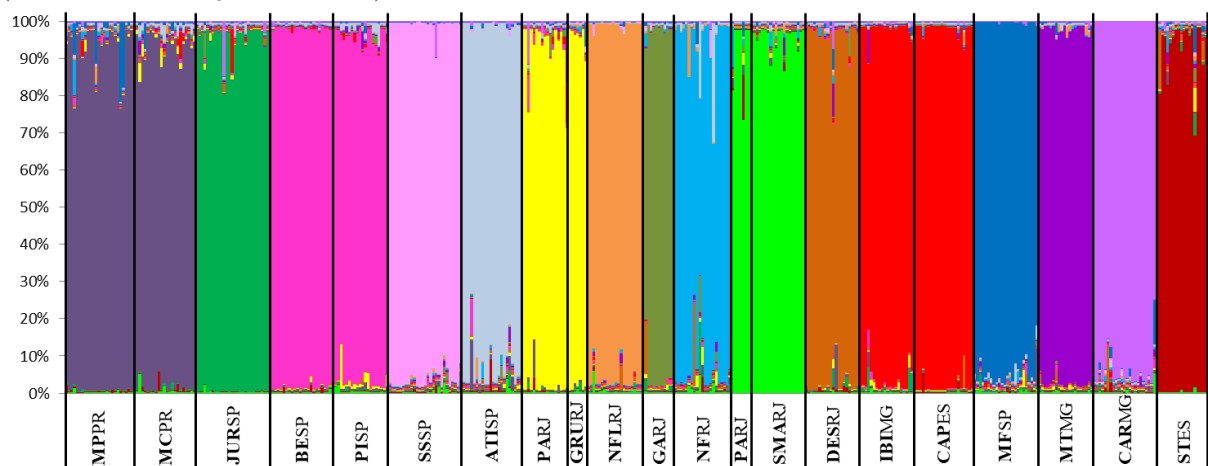


Figura 6: Valor de ΔK gerado pelo programa Structure Harvester Web v0.6.94. a partir do modelo proposto por Evanno et al. (2005).

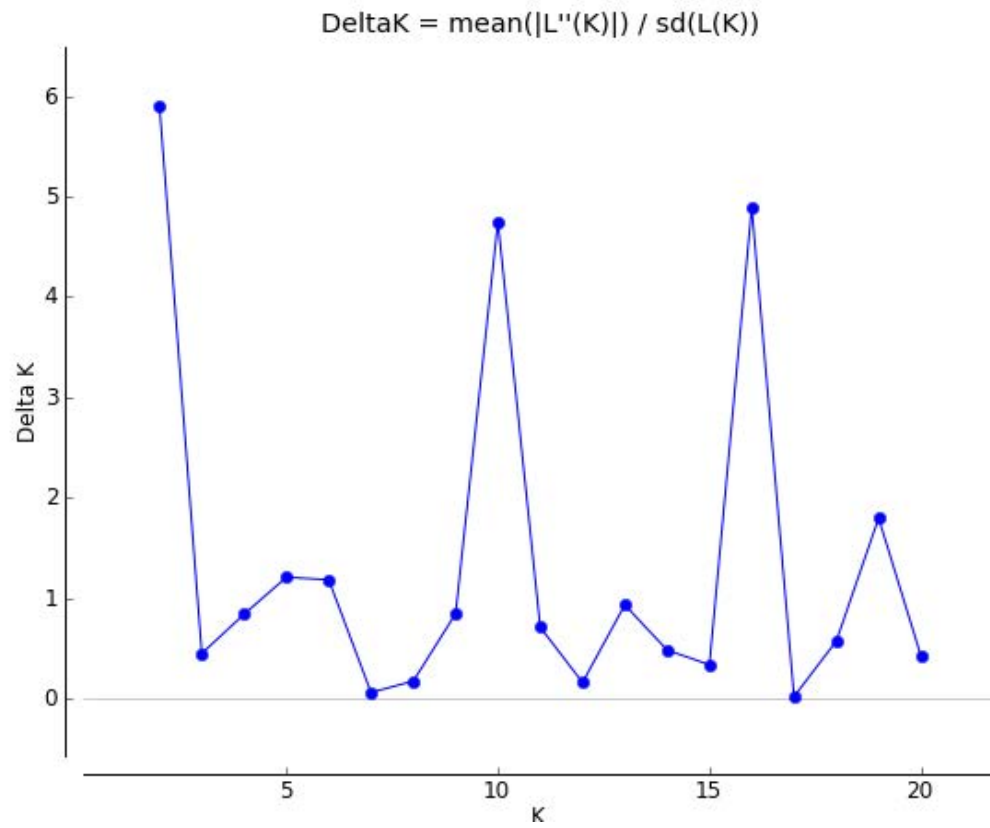


Figura 7: Resultado da Análise das Coordenadas Principais (PCoA), incluindo todas as populações.

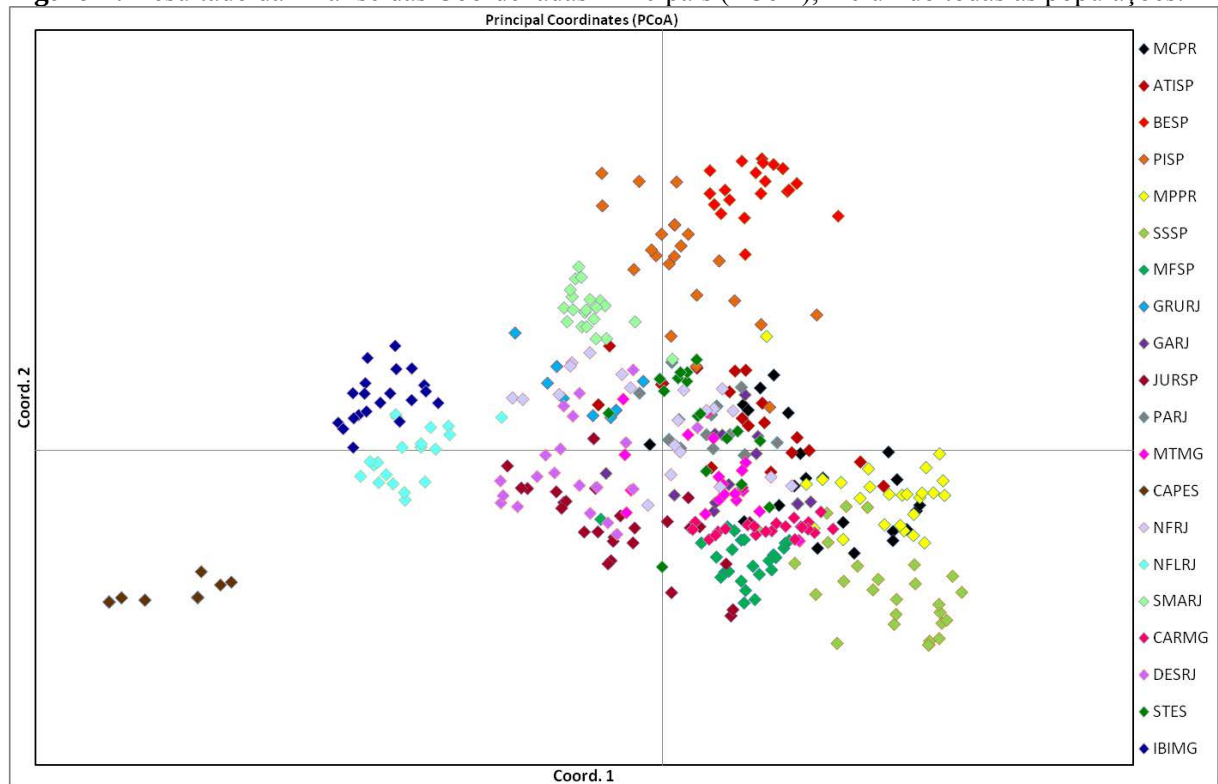


Figura 8: Resultado da análise das Coordenadas Principais (PCoA), com a população CAPES retirada, para a melhor visualização e expansão da distribuição das demais populações.

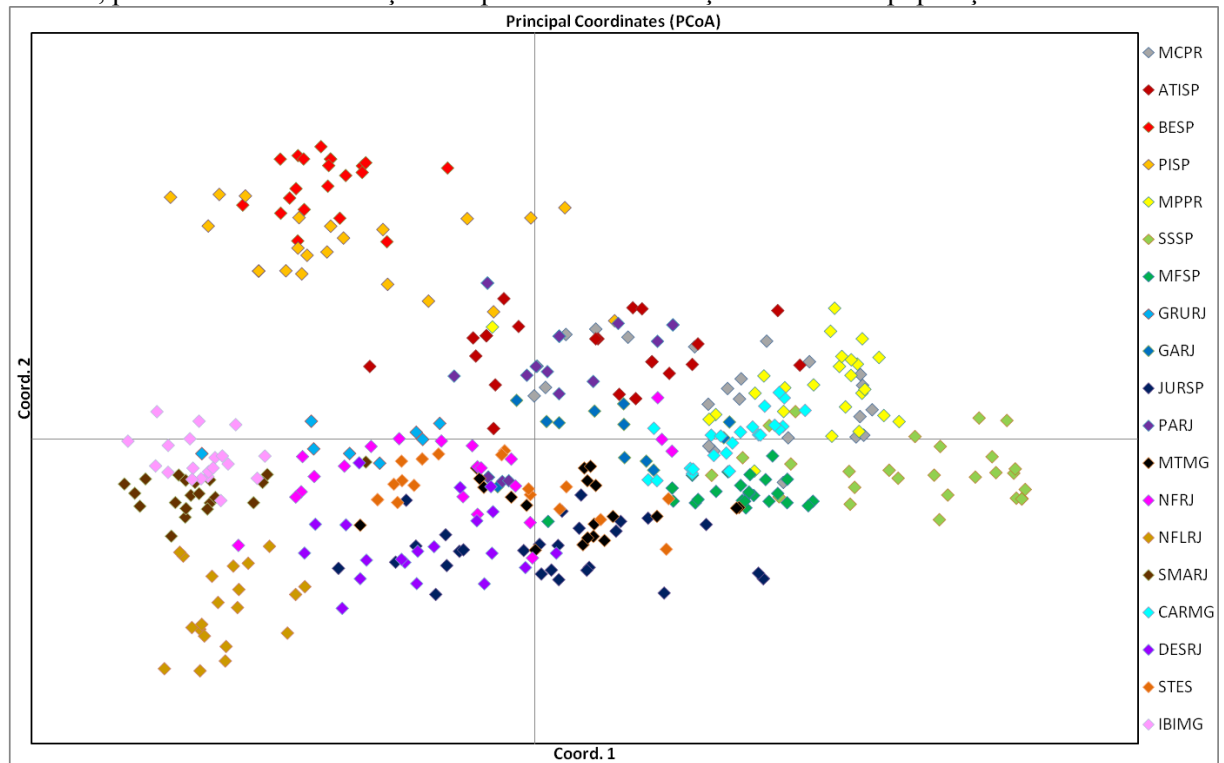
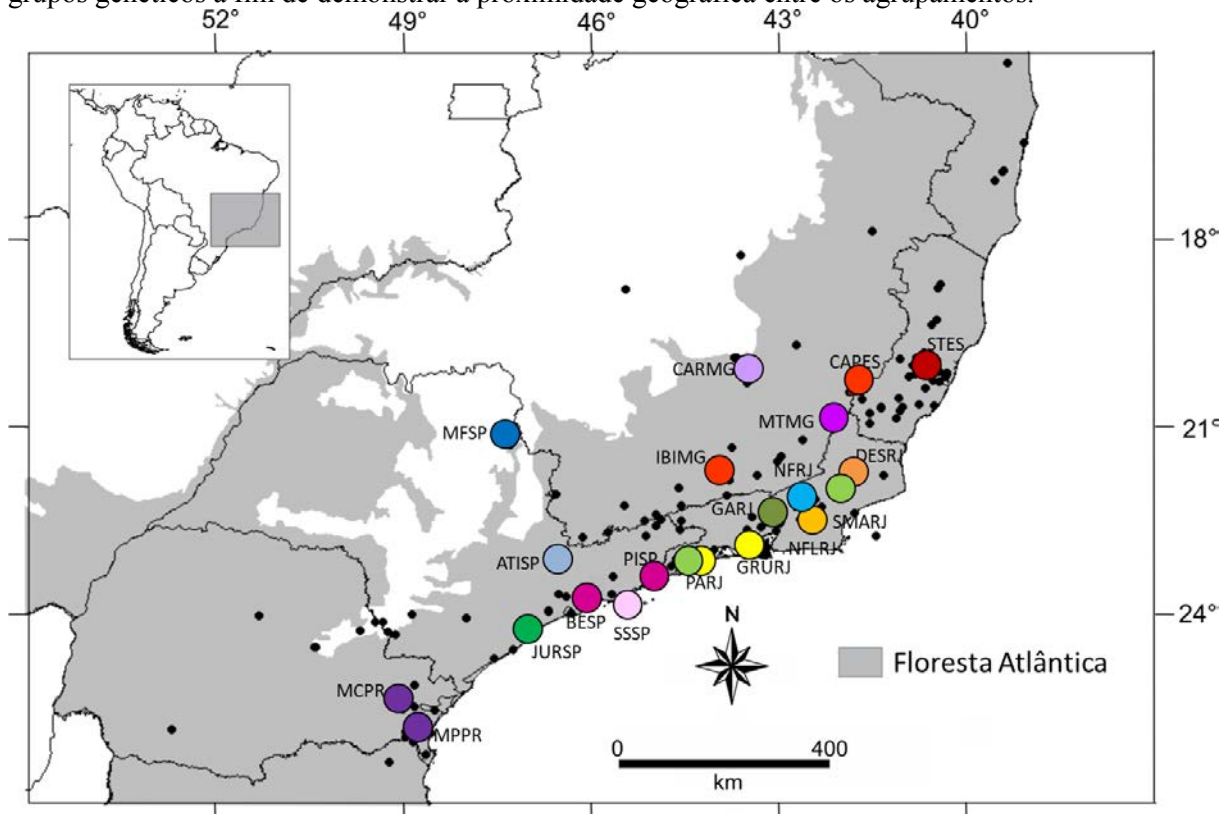


Figura 9: Resultados do STRUCTURE, distribuídos no mapa. Esta análise teve como resultado $K=16$, portanto, 16 grupos genéticos, dentro de 20 populações. As diferentes cores representam os diferentes grupos genéticos a fim de demonstrar a proximidade geográfica entre os agrupamentos.



5 DISCUSSÃO

Afloramentos rochosos, amplamente distribuídos em regiões tropicais e temperadas do mundo, podem ser comparáveis às ilhas oceânicas, em função dos seus efeitos sobre padrões de variabilidade genética e fluxo gênico, com grande potencial para estudos evolutivos e ecológicos (POREMBSKI; BARTHLOTT, 2000). O complexo de espécies *Pitcairnia flammea* possui uma distribuição populacional geograficamente disjunta, localizado em afloramentos rochosos ao longo da Floresta Atlântica Brasileira, podendo contribuir para o entendimento de como ocorre a coesão de uma espécie com populações isoladas e como esta afeta na sua estruturação e diversidade genética.

5.1 Diversidade Genética

As populações de *P. flammea* apresentaram valores intermediários de diversidade genética, comparados com outras espécies de bromélias. Pôde-se observar uma variação destes resultados entre as populações, como por exemplo, a população de Alto do Caparaó-ES (CAPES), que apresentou índices muito baixos de diversidade genética e a população do Município de Tombos-MG (MTMG) que apresentou índices muito altos de diversidade genética (Tabela 3).

A média dos resultados de heterozigosidades observadas e esperadas são similares a outras espécies de bromélias saxícolas, como *Encholirium spectabile*, encontrada na Caatinga, no nordeste do Brasil (GONÇALVES-OLIVEIRA et al., 2017), *Vriesea minarum*, endêmica da região do Quadrilátero Ferrífero (LAVOR et al., 2014), *Alcantarea imperialis* e *A. geniculata*, encontradas na Floresta Atlântica (BARBARÀ et al., 2007), e terrestres, como a *Bromelia antiacantha*, que ocorre nas restingas da Floresta Atlântica, (ZANELLA et al., 2011) e *Vriesea gigantea*, que pode ser epífita, saxícola ou terrestre, endêmica da Floresta Atlântica, no sudeste do Brasil (PALMA-SILVA et al., 2009). Em todos estes estudos, pode-se observar que a heterozigosidade observada é menor do que a esperada, devido ao déficit de heterozigotos. O mesmo ocorre com as populações de *P. flammea* e este padrão pode ser explicado pela presença de endogamia, que aumenta a homozigose, e baixo fluxo gênico entre as populações, sugerindo que as populações que ocorrem em afloramentos rochosos, por serem menores e disjuntas, apresentem menores índices de diversidade genética.

Em decorrência da deficiência em heterozigotos, os valores de coeficiente de endogamia foram positivos e significantes para a maioria das populações, indicando que não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes resultados podem ser comparados a outros estudos genéticos de populações de bromélias, como *Pitcairnia albiflos* e *P. staminea* (PALMA-SILVA et al., 2011), *A. imperialis* e *A. geniculata* (BARBARÀ et al., 2007), *V. minarum* (LAVOR et al., 2014), *V. gigantea* (PALMA-SILVA et al., 2009) e *Aechmea winkleri* (GOETZE et al., 2015), que revelaram valores de F_{IS} moderados a altos, com fluxo gênico restrito, evidenciando ser um padrão comum entre as bromélias. Pode-se sugerir que a presença de endogamia nas populações de *P. flammea*, possa ocorrer tanto pela autofecundação (já que a espécie é auto-compatível), quanto pelo cruzamento com indivíduos aparentados, no caso das populações pequenas e com baixa diversidade genética. Portanto, pode-se dizer que o coeficiente de endogamia é um importante impulsionador da diversificação e evolução de espécies vegetais que vivem em inselbergs, devido à limitada conexão entre as populações disjuntas (MILLAR et al., 2013).

O coeficiente de endogamia apresentou uma grande variação entre as populações, concentrando seus maiores valores nas localidades costeiras (Figura 4), podendo indicar que há uma variação nas estratégias e no sistema reprodutivo das diferentes populações. Estudos anteriores sobre o sistema reprodutivo de *P. flammea* em uma região simpátrica, indicaram a presença de altos índices de autocompatibilidade e dependência de agentes polinizadores (beija-flores) que promovem a autopolinização, sugerindo que a evolução para a autofecundação pode ser motivada pela necessidade de evitar custos de adaptação associada à hibridação entre espécies relacionadas com barreiras pré ou pós-zigóticas incompletas (WENDT et al., 2002).

5.2 Estrutura genética e fluxo gênico

Os resultados obtidos através da análise de variância molecular (AMOVA) evidenciaram uma alta estruturação genética entre as populações, sugerindo que exista baixo fluxo gênico entre elas. Um caso semelhante de alta estruturação genética entre as populações pode ser observado em outra espécie do gênero, a *Pitcairnia geyskessi* ($F_{ST}=0.322$), que ocorre em afloramentos rochosos da Guiana Francesa (SARTHOU et al., 2001). *Encholirium horridum*, outra espécie de bromélia adaptada a ambientes de afloramentos rochosos, também apresentou forte estruturação genética, com dispersão reduzida (HMELJEVSKIET al., 2017). Assim como a *Alcantarea imperialis*, que exibe uma alta diferenciação populacional, além da

esperada com base no seu sistema de cruzamento (fecundação cruzada), indicando que, o fluxo gênico restrito devido à distribuição fragmentada dos inselbergs, é a causa mais provável da alta estruturação desta espécie (BARBARÀ et al., 2007). Outros estudos com resultados similares podem ser observados em outras espécies de plantas que ocorrem em ambientes de afloramentos rochosos, como a *Epidendrum secundum* e *E. cinnabarinum* (Orchidaceae), adaptadas a inselbergs Neotropicais no nordeste do Brasil (PINHEIRO et al., 2014), *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae), endêmica de afloramentos graníticos na região florística do sudoeste da Austrália, (BYRNE; HOPPER, 2007) e *Phacelia dubia* (Boraginaceae), endêmica de afloramentos graníticos no leste dos Estados Unidos (LEVY; NEAL, 1999). Com isso, pode-se sugerir que a diferenciação genética é uma característica comum em espécies que vivem em ambientes isolados, como os afloramentos rochosos, devido ao fluxo gênico limitado entre as populações.

A análise Bayesiana confirma a alta estruturação genética entre as populações de *P. flammea*, separando quase que todas as populações em grupos genéticos diferentes. A maioria das populações que foram agrupadas em um mesmo grupo genético apresentam certa proximidade geográfica (Figura 9), como as populações de Campina Grande do Sul-PR e Guaratuba-PR (MCPR e MPPR), Bertioga-SP e Picinguaba-SP (BESP e PISP) e Paraty-RJ e Grajaú-RJ (PARJ e GRURJ). A escolha em adotar o maior valor de K como o mais biologicamente correto pode ser justificado pelo fato de as populações serem bem estruturadas, com baixo fluxo gênico e por possuírem algumas populações com altos valores de F_{IS} , podendo interferir nos resultados do programa, já que este considera que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Portanto, foi realizada uma análise das coordenadas principais (PCoA), visto que esta não leva em consideração os pressupostos do eHW, confirmando a alta estruturação entre as populações.

Os níveis de diferenciação genética entre as variedades (F_{CT}) do complexo *Pitcairnia flammea*, foram muito baixos e não significantes (P -value=0.1633), enquanto que, entre as populações, a diferenciação genética (F_{ST}) foi alta e com valores significativos (P -value<0.0001). O valor de diferenciação genética entre as populações, dentro das variedades (F_{SC}), também foi maior do que entre as variedades. Pode-se sugerir que a estruturação das variedades não é consistente, pois, independente de considerar as variedades como um grupo, a maior diferenciação genética continua sendo entre as populações, reforçando a ideia de que as populações são bem estruturadas entre si.

Os valores do número efetivo de migrantes (N_{em}), calculados para cada par de populações, com base no F_{ST} par a par, foram muito baixos, com valores, em sua maioria,

inferiores ao mínimo esperado para a manutenção da coesão de uma espécie ($N_{em} < 1$, WRIGHT, 1931), indicando que há um fluxo gênico restrito entre as populações. No entanto, Morjan et al. (2004), discutem que a seleção natural, pode ser importante para a dispersão de alelos vantajosos, operando para a manutenção da coesão das espécies que possuem populações altamente estruturadas em ambientes de inselbergs. Assim, alelos sob seleção natural requerem níveis mais baixos de fluxo gênico para se espalhar entre as populações.

Como não foram encontrados evidências de sinal de Bottleneck em praticamente nenhuma das populações, pode-se dizer que provavelmente não houve uma redução populacional recente para a maioria das populações analisadas. De acordo com Millar et al. (2013), a alta estruturação filogeográfica e genética sinaliza um isolamento por distância e a falta de evidências de bottleneck sugere a estabilidade em longo prazo das distribuições populacionais contemporâneas e tamanhos populacionais.

5.3 Conservação

A conservação das espécies adaptadas a afloramentos rochosos é de grande importância, pois são áreas de hotspots de espécies endêmicas, com ecossistemas praticamente intocados e elevado grau de diferenciação florística em pequenas distâncias. A vegetação saxícola de inselbergs no sudeste do Brasil é extremamente rica em espécies perenes resistentes à seca. São ambientes rigorosos com terrenos ríspidos e, portanto, não atrativos para a agricultura, porém a extração em larga escala de granito e gnaiss para fins de construção civil são uma forma devastadora de uso humano, podendo levar espécies localmente restritas à extinção (POREMBSKI et al., 2007). Atualmente, muitas paisagens de afloramentos rochosos, são em sua maioria, cercados por operações agrícolas e pastagens e não estão incluídas em nenhuma área integral protegida. A maioria das áreas montanhosas brasileiras ainda carece de planos específicos de conservação e manejo, necessitando com urgência de políticas públicas para a conservação desses ambientes (HMELJEVSKI et al., 2017). O isolamento dos inselbergs e sua longa persistência (geologicamente antiga e estável) contribuem para a diferenciação das populações locais e desempenham importante papel para o processo de especiação nessas áreas de hotspots (POREMBSKI et al., 2007).

A distribuição fragmentada em inselbergs pode levar a níveis muito altos de diferenciação populacional, com fluxo gênico restrito e conectividade populacional reduzida, mesmo em espécies com sistema de cruzamento predominantemente cruzado (BARBARÀ et al., 2007). Além de possuir localização distribuída em afloramentos rochosos, que contribuem

para a alta estruturação genética, as populações de *P. flammea* apresentam grande diversidade morfológica entre elas e sistemas reprodutivos não bem definidos, corroborando para a dificuldade de enquadrar todas as populações como uma única espécie.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, é possível apoiar o fato de que afloramentos rochosos são vistos como centros de diversidade de espécies e endemismo, por serem naturalmente isolados, contribuindo para a grande diversidade genética e morfológica observada atualmente nestas regiões.

A alta estruturação genética apresentada entre as populações do complexo *P. flammea*, pode ser observada independente das variedades existentes, reforçando a ideia de que estas populações estão evoluindo e diversificando há muito tempo, independentes umas das outras.

7 REFERÊNCIAS

- Aoki-Gonçalves F, Louzada RB, de Souza LM, Palma-Silva C (2009) Microsatellites for *Orthophytum ophyuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) Endemic to Rock Outcrops Of Caatinga Biome In Brazil. Applications in Plant Sciences. *In review*.
- Avice JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, **36**, 3–15.
- Bandelt H-J, Forster P, Roehl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- Barbarà 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*, **16**, 1981–1992.
- Barbarà T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay M, Mayo S, Lexer C (2009) Genetic relationship and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to Neotropical “inselbergs”, *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata*, and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany*, **103**, 65–77.
- Barfuss MHJ, Samuel R, Till W, Stuessy TF (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany*, **92**, 337–351.
- Beerli P (2004) Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. *Molecular Ecology* **13**, 827–836.
- Beerli P, Felsenstein J (1999) Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, **152**, 763–773.
- Benzing FH (2000) Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Boneh L, Kuperus P, Van Tienderen PH (2003) Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 302–303.
- Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdiere J, Sarthou C (2010) Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana – a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography*, **33**, 175–184.
- Byrne, M., & Hopper, S. D. (2007). Granite outcrops as ancient islands in old landscapes: evidence from the phylogeography and population genetics of *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae) in Western Australia. *Biological Journal of the Linnean Society*, **93**(1), 177–188.
- Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI, Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation*, **15**, 1572–9710.
- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 167–169.

Diniz-Filho JAF, de Campos Telles MP, Bonatto SL et al. (2008) Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography*, **35**, 753–763.

Excoffier, L., and H. E. L. Lischer (2010) Arlequin suit ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564–567.

Faria APG, Wendt T, Brown GK. 2004. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae: Bromelioideae) and allied genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **91**, 303–319.

Givnish TJ, Millam KC, TM Evans, Hall JC, Pires JC, Berry PE, Sytsma KJ (2004) Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south american–african disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on ndhf sequence data. *International Journal of Plant Science*, **165**, S35–S54.

Givnish TJ, Millam KC, Berry PE, Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of bromeliaceae inferred from ndhf sequence data. *Aliso*, **23**, 3–26.

Givnish TJ, Barfuss MH, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska P, Jabaily R, Crayn D, Smith J, Winter K, Brown G, Evans T, Holst B, Luther HE, Till W, Zizka G, Berry P, Sytsma K (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, **98**, 872–895.

Goetze, M., Büttow, M. V., Zanella, C. M., Paggi, G. M., Bruxel, M., Pinheiro, F. G., ... Bered, F. (2015). Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, **58**, 204–210.

Gonçalves-Oliveira, R. C., Wöhrmann, T., Benko-Iseppon, A. M., Krapp, F., Alves, M., Wanderley, M. das G. L., & Weising, K. (2017). Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *American Journal of Botany*, **104**(6), 868–878.

Goudet, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Ver. 2.9.3. Available from: <http://www.unil.ch/izeas/software/fstat.html>

Hmeljevski, K.V., Nazareno, A. G., Leandro Bueno, M., dos Reis, M. S., & Forzza, R. C. (2017). Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. *Ecology and Evolution*, **7**(13), 4704–4716

Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H et al. (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science*, **330**, 927–931.

Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**, 725–738.

Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**, 2868–2872.

Lavor, P., van den Berg, C., Jacobi, C. M., Carmo, F. F., & Versieux, L. M. (2014). Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaco Range, Brazil. *American Journal of Botany*, **101**(7), 1167–1175

- Ledru MP, Braga PIS, Soubiès F, Fournier M, Martin L, Suguio K, Turcq B (1996) The last 50,000 years in the Neotropics (southern Brazil): evolution of vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **123**, 239-257.
- Levy, F., & Neal, C. L. (1999). Spatial and temporal genetic structure in chloroplast and allozyme markers in *Phacelia dubia* implicate genetic drift. *Heredity*, **82**(4), 422–431.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC (2008). Bromeliaceae da Mata
- Millar, M. A., Coates, D. J., & Byrne, M. (2013). Genetic connectivity and diversity in inselberg populations of *Acacia woodmaniorum*, a rare endemic of the Yilgarn Craton banded iron formations. *Heredity*, **111**(5), 437–444.
- Morjan, C. L., & Rieseberg, L. H. (2004). How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Molecular Ecology*, **13**(6), 1341–1356.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Notes*.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, et al. (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes* **7**, 654–657.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity*, **103**, 503–512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F et al. (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology*, **20**, 3185–3201.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, **28**, 2537–2539. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>
- Petit, El Mousadik & Pons (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, **12**, 844-855.
- Pinheiro, F., Cozzolino, S., Draper, D., de Barros, F., P Félix, L., F Fay, M., & Palma-Silva, C. (2014). Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. *BMC Evolutionary Biology*, **14**(1), 49.
- Porembski S, (2007) Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica*, **30**, 579–586.
- Porembski S, Barthlott W (2000) Inselbergs. Biotic Diversity of Isolated Rock Outcrops in Tropical and Temperate Regions. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.

- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Rizzini CT (1979) Tratado de fitogeografia do Brasil – Aspectos sociológicos e florísticos. Ed. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brazil. 375p.
- Rull V (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**, 508–513.
- Rull V (2012) Palaeobiodiversity and taxonomic resolution: linking past trends with present patterns. *Journal of Biogeography*, **39**, 1005-1006.
- Sarthou C, Samadi S, Boisselier-Dubayle MC (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany*, **88**, 861–868.
- Scarano, F.R., 2009. Plant communities at the periphery of the Atlantic rain forest: rare- species bias and its risks for conservation. *Biological Conservation*, **142**, 1201–1208.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, **22**, 1193-1213
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW and Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, **98**, 1511-1519.
- Zanella C M , Janke A , Palma-Silva C , Kaltchuk-Santos E , Pinheiro F G , Paggi G M , Soares L E S , Goetze M , Buttow M V , Bered F (2012). Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*, **35**, 1020-1026
- Zhang D-X, Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, **12**, 563–584.
- Van Der Niet T, Johnson SD, Linder HP (2006) Macroevolutionary data suggest a role for reinforcement in pollination system shifts. *Evolution*, **60**, 1596–16016
- Wagner, N., D. Silvestro, D. Brie, P. L. Ibisch, G. Zizka, K. Weising & K. Schulte (2012): Spatiotemporal evolution of *Fosterella* (Bromeliaceae) in the Central Andean biodiversity. *Journal of Biogeography*, **40**, 869–880.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wendt, T., Canela, M. B. F., Klein, D. E., & Rios, R. I. (2002). Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **232**(3-4), 201–212.
- Wendt T, Coser TS, Matallana G, Guilherme FAG (2008). An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, **275**, 31-41.
- Wendt T, Paz NPL, Rios RI (2000) A morphometric analysis of a putative hybrid between *Pitcairnia albiflos* and *P. staminea* (Bromeliaceae). *Selbyana*, **21**, 132-136.

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

Wöhrmann T, Wagner N, Krapp F, Huettel B, Weising K (2012) Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Amer J Bot* [published online]:e160–e163.

Wöhrmann, T., D. S. d. B. Pinangé, F. Krapp, A.-M. Benko-Iseppon, B. Huettel & K. Weising (2012): Development of 15 nuclear microsatellite markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources* published online first

8 ANEXOS

8.1 Anexo A - Protocolo de amplificação em PCR de microssatélites nucleares (Palma-Silva et al., 2007)

Master Mix (MM) recipe		
(concentration needed) working		
solution	[] stock sol.	µl per 10 µl rxn
H2O	-	2,5
Masrter mix GoTaq	5x	5
(10pmol) F primer @ 10pmol/µl	10pmol	0,5
(10pmol) R primer @ 10pmol/µl	10pmol	1
(1pmol) M13 primer @ 1µM (FAN)	1pmol	1
template DNA	5ng/µl	1
Total		11

PCR program: touchdown, TA=48°C

3' @ 95°C (pre-melt)

10 cycles of:

30" @ 94 °C (denature)

30" @ TA+10 (TA-1°C/cycle)

(annealing)

30" @ 72°C (extension)

30 cycles of:

30" @ 94 °C (denature)

30" @ TA°C

(annealing) 30" @

72°(extension)

final extension

10' @ 72oC

∞ @ 4°C