

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

YUMI SHEU

**A INFLUÊNCIA DE FATORES HISTÓRICOS NA DIVERSIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
Pitcairnia azouryi (BROMELIACEAE) RESTRITA A INSELBERGS DA FLORESTA ATLÂNTICA**

ALEGRE – ES

2020

YUMI SHEU

**A INFLUÊNCIA DE FATORES HISTÓRICOS NA DIVERSIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
Pitcairnia azouryi (BROMELIACEAE) RESTRITA A INSELBERGS DA FLORESTA ATLÂNTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

Orientadora: Dra. Tais Cristina Bastos Soares
Coorientadores: Dr. Fábio Demolinari de Miranda e Dra. Tatiana Tavares Carrijo

ALEGRE – ES

JULHO – 2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S539i Sheu, Yumi, 1990-
A influência de fatores históricos na diversificação de
populações de *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae) restrita a
inselbergs da Floresta Atlântica / Yumi Sheu. - 2020.

105 f. : il.

Orientadora: Tais Cristina Bastos Soares. Coorientadores:
Fábio Demolinari de Miranda, Tatiana

Tavares Carrijo.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramentos) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

1. Bromeliaceae. I. Cristina Bastos Soares, Tais. II.
Demolinari de Miranda, Fábio. III. Tavares Carrijo, Tatiana.
IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 631.523

YUMI SHEU

**A INFLUÊNCIA DE FATORES HISTÓRICOS NA DIVERSIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES DE
Pitcairnia azouryi (BROMELIACEAE) RESTRITA A INSELBERGS DA FLORESTA
ATLÂNTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

Data de aprovação: 21 / 08 / 2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Tais Cristina Bastos Soares
Orientadora (UFES)



Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda
Co-orientador (UFES)



Prof. Dr. Mário Luis Garbin
Examinador externo ao programa (UFES)



Prof. Dr. Vítor Hugo dos Santos Gomes Maia
Examinador externo a instituição (PUC-RJ)



Prof. Dr. Dayvid Rodrigues Couto
Examinador externo a instituição (UENF)

Ao meu querido pai Sr. Sheu Yin Min e Sra. Maria de Fátima.
Às minhas irmãs e aos meus cachorros (Lino, Amora e Estrela)
Por serem tudo na minha vida

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente aos meus pais e a minha família e ao meu namorado que me deram um grande apoio quando decidi retornar para Alegre, e ainda mais, quando eu decidi fazer dessa jornada a realização conjunta com meu antigo sonho.

A minha orientadora Tais Cristina Bastos Soares pelos ensinamentos ao longo desses árduos anos, os valorosos conselhos e imenso aprendizado, pela compreensão, apoio e confiança em mim depositada, pela disponibilidade e ajuda mesmo quando dispunha de muitos compromissos, e principalmente, por colaborar para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao meu coorientador Fábio Demolinari de Miranda, a quem considero minha inspiração nessa jornada riquíssima e que apesar de todas as escolhas que fiz nesses anos, sempre esteve me apoiando e me incentivando continuamente.

A Universidade Federal do Espírito Santo pela sólida formação acadêmica e ao programa de Pós – Graduação em Genética e Melhoramento– PPGGM /UFES.

A Fundação de Amparo do Espírito Santo – FAPES, pelo auxílio financeiro ao projeto e a concessão da bolsa de doutorado.

Ao meu advogado e amigo Diego na qual eu só tenho gratidão e admiração e que nada disso seria possível.

Aos amigos que há anos me aturam e que tornaram meus dias no laboratório menos estressantes, em especial: Toda a família do BQMol, as tias da limpeza, Soninha, e meus queridos amigos do final de semana que estão ainda aqui ou que já alçaram novos voos: Nora, Priscila, Joazito, Amélia, Luara, Cris, Felipe, Lucimara, Paulinha, Paulo e tantos outros pela agradável convivência todos os dias e grata às pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente para o meu crescimento Obrigada!

Agradeço também aos amigos e amigas (quase todos mundos períodos!) que fiz no curso da Vet e dos professores (Douglas, Felipe, Samuel, Jankerle, Elizabeth, Marcus, Dirlei, Érika, Louis, Zanini, Isabella e outros) sempre se disponibilizaram a ajudar e entender a minha situação, além de serem detentores de um vasto conhecimento. Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

YUMI SHEU, filha de Sheu Yin Min e Maria de Fátima Nishiuchi Sheu, nasceu em Osasco, São Paulo, em 1 de dezembro de 1990. Em março de 2009, iniciou a graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus de Alegre, colando grau em julho de 2013. Durante a graduação foi monitora de diversas disciplinas como Biologia Celular, Biologia Molecular e Genética. Foi bolsista voluntária de iniciação científica por três anos consecutivos, onde desenvolveu diversas atividades de pesquisa em biologia molecular, diversidade e genética de populações. Em março de 2014, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), submetendo-se à defesa de dissertação em junho de 2016. Tem conhecimento nas áreas de filogenia, modelagem climática, filogeografia e evolução. Em agosto de 2016, ingressou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (UFES) na linha de Biotecnologia submetendo-se à defesa de tese em julho de 2020.

SUMÁRIO

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Filogeografia - um ramo da Biogeografia	2
2.2. Floresta Atlântica: aspectos gerais e de biodiversidade	3
2.3. <i>Inselbergs</i> : aspectos gerais e evolutivos	6
2.4. Explicando a diversificação da biota por hipóteses biogeográficas ..	10
2.4.1. Barreiras riverinas e morfoestruturas	11
2.4.2. Hipótese de refúgios	12
2.4.3. Hipótese de gradientes ecológicos	14
2.5. A família Bromeliaceae	14
2.5.1. Sistemática e evolução de Bromeliaceae	17
2.5.2. O gênero <i>Pitcairnia</i> L'Her	19
2.5.3. Espécie taxonômica alvo: <i>P. azouryi</i>	20
2.6. Marcador cloroplastidial (cpDNA): implicações filogeográficas para a evolução.....	23
3. CONCLUSÃO	25
4. REFERENCIAS	26
Capítulo I	40
Introdução	43
Material e Métodos	45
Resultados	52
Discussão.....	59
Conclusão	66
Agradecimentos.....	67
Contribuição dos autores	67
Conflito de interesses	67
Referências	68
Lista de Tabela.....	77
Lista de Figura	82
Material Suplementar	89

SHEU, Yumi. **A influência de fatores históricos na distribuição e diversificação de *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae) restrita a *inselbergs* da Floresta Atlântica**. 2020. 105p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento/Biotecnologia). Universidade Federal do Espírito Santo, ES.

RESUMO

A Filogeografia investiga os processos evolutivos que governam a distribuição das espécies em escala espacial e temporal. Inúmeros estudos utilizam abordagens filogeográficas para entender a diversificação das espécies no contexto de regiões com elevada diversidade genética. A região Neotropical abriga diferentes domínios fitogeográficos, como a Floresta Atlântica. Nesse contexto, os *inselbergs* destacam-se pela heterogeneidade vegetacional e estrutural que apresentam na Floresta Atlântica. Devido a sua natureza geográfica disjunta, os *inselbergs* são comparados às ilhas oceânicas e exibem elevado grau de isolamento ecológico e grande endemismo de espécies. Realizamos uma análise baseada em dados filogeográficos e populacionais integrados para investigar a diversificação de sete populações naturais de *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae) restrita aos *inselbergs* da Floresta Atlântica e como estas se relacionam a fatores históricos evolutivos. Estimou-se uma árvore coalescente utilizando cinco marcadores cloroplastidiais (cpDNA) e recuperou-se a população Pedra Lisa (Rio de Janeiro) como a mais basal no Pleistoceno do Quaternário. Sugerimos um papel importante das flutuações climáticas no início do Pleistoceno na diversificação dos dois agrupamentos de *P. azouryi*. Nossos resultados mostraram baixa diversidade genética dentro das populações de *P. azouryi* e alta estrutura genética populacional, indicando fluxo gênico limitado entre afloramentos rochosos. Todas as populações são prioritárias a conservar o patrimônio genético, uma vez que conferiram haplótipos singulares. Este estudo apontou o papel dos eventos históricos e de deriva genética via *stepping stones* nas trajetórias evolutivas desta espécie ameaçada e de ocorrência restrita a sete *inselbergs* da Floresta Atlântica.

Palavras-chave: bromélias, Pitcarnioideae, *Pitcarnia*, especiação, deriva genética

SHEU, Yumi. **The influence of historical factors on the distribution and diversification of *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae) restricts inselbergs in the Atlantic Forest.** 2020. 105p. Thesis (Doctorate in Genetics and Breeding/Biotechnology). Federal University of Espírito Santo, ES.

ABSTRACT

Phylogeography investigates the evolutionary processes that govern the distribution of species on a spatial and temporal scale. Countless studies use phylogeographic approaches to understand the diversification of species in the context of regions with high genetic diversity. The Neotropical region is home to different phytogeographic domains, such as the Atlantic Forest. In this context, inselbergs stand out for their structural and structural heterogeneity in the Atlantic Forest. Due to their disjunct geographic nature, inselbergs are compared to oceanic islands and exhibit a high degree of ecological isolation and great endemism of species. We conducted an analysis based on integrated phylogeographic and population data to investigate the diversification of seven natural populations of *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae) restricted to the inselbergs of the Atlantic Forest and how they relate to evolutionary historical factors. A coalescing tree was estimated using five chloroplast markers (cpDNA) and the Pedra Lisa population (Rio de Janeiro) was recovered as the most basal in the Quaternary Pleistocene. We suggest an important role for climatic fluctuations at the beginning of the Pleistocene in the diversification of the two groups of *P. azouryi*. Our results showed low genetic diversity within the populations of *P. azouryi* and high population genetic structure, indicating limited gene flow between rocky outcrops. All populations are a priority to conserve genetic heritage, since they have conferred unique haplotypes. This study pointed out the role of historical events and genetic drift via stepping stones in the evolutionary trajectories of this threatened species and restricted to seven inselbergs in the Atlantic Forest.

Keywords: bromeliads, Pitcarnioideae, *Pitcarnia*, speciation, genetic drift

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica. A influência de fatores históricos na distribuição e diversificação de *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae) restrita a *inselbergs* da Floresta Atlântica

Figura 1. Teoria de Refúgios Pleistocenos proposto por Haffer (1969) ao longo das flutuações climáticas. Regiões cinzas significam as áreas ocupadas por florestas tropicais; regiões brancas marcam a ocupação dos blocos savânicos. Seta azul: demonstra a escala temporal de redução da Floresta Atlântica em refúgios quando o clima estava mais seco e frio do Pleistoceno; Seta vermelha: demonstra a escala temporal de expansão dos refúgios florestais quando o clima retornou como mais quente e úmido no mesmo período.13

Figura 2. Cronograma cruzado com as probabilidades verossimilhança para evolução de bromélias com base na filogenia de máxima verossimilhança dos 8 marcadores. Cada barra indica o desvio padrão em torno dos tempos de divergência estimada de cada nó correspondente (GIVNISH et al., 2011)..... 19

Figura 3. *P. azouryi* em seu habitat natural: (A - B) espécimes no início da floração e distribuição em manchas de vegetação rupícola (Fonte: Arquivo pessoal)21

Figura 4. Distribuição geográfica das sete localidades de ocorrência de *P. azouryi*: (1). Pedra Lisa-Burarama; (2) Pedra do Jacú; (3) Pedra das Andorinhas; (4) Pedra Três Irmãs; (5) Pedra Parada Cristal; (6) Pedra do Baú e (7) Pedra Lisa-Campos. (Extraído e adaptado de Manhães et al., 2016).....22

Capítulo I. *Insights* na diversificação de espécies neotropicais com base em uma bromélia endêmica restrita a *inselbergs*

Figura 1. Distribuição geográfica das sete localidades de ocorrência de *P. azouryi*. (1) Pedra Lisa-Burarama; (2) Pedra do Jacú; (3) Pedra das Andorinhas; (4) Pedra Três Irmãs; (5) Pedra Parada Cristal; (6) Pedra do Baú e (7) Pedra Lisa-Campos..... 83

Figura 2. Gráfico das transições e transversões (eixo y) em função da diversidade nucleotídica (eixo x), calculada sob o modelo Tamura-Nei (1984). As

transições são representadas pelas linhas de coloração azul e a transversões pelas linhas de cor verde..... 84

Figura 3. Árvore gênica concatenada (cpDNA) por máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB). Em cada ramo das árvores, é exibido os valores de bootstrap (*bs*) e probabilidade posteriori (*pp*), respectivamente.....85

Figura 4. Arvore filogenética sob o modelo coalescente de datação molecular calibrada baseada nos 5 marcadores cloroplastidiais concatenados, de acordo com datação do nó da subfamília Pitcarnioideae (GIVNISH *et al.*, 2011). Eixo em cinza representa a escala de tempo de 0 (presente) até 12,25 milhões de anos, com intervalos de 2,5 milhões de anos. Bolinhas pretas indicam que $pp > 90\%$ de confiança dos nós. Enquanto que bolinhas vermelhas refere-se a $pp < 90\%$ dos nós amostrados..... 86

Figura 5. Panorama integrativo da dinâmica evolutiva de *P. azouryi*. (A) Árvore de linhagens resultante das análises filogenéticas. Os valores de *pp* estão representados com bolinhas vermelhas ($pp < 90\%$) e pretas ($pp > 90\%$) conforme indicado na figura. Cada agrupamento está identificado e associada ao resultado do *Barplot* gerado pela análise do BAPS representada na figura pela coluna à direita. B) Distribuição geográfica das amostras utilizadas neste trabalho. Os pontos representam as populações amostradas e as cores dos círculos correspondem à coloração atribuída de acordo com o BAPS e a filogenia. C) Rede de haplótipos dos marcadores cloroplastidiais concatenados..... 87

Figura 6. Correlação entre a distância genética no eixo Y e a distância geográfica no eixo X. Há evidências de alguma relação estatística significativa ($p > 0,05$) 88

LISTA DE TABELAS

Capítulo I. *Insights* na diversificação de espécies neotropicais com base em uma bromélia endêmica restrita a *inselbergs*

- Tabela 1.** Número de amostras totais das populacionais da espécie *P. azouryi*. De acordo com a localidade, coordenada geográfica e número de indivíduos coletados respectivamente..... 79
- Tabela 2.** *Primers* foram testados e utilizados para a amplificação e sequenciamento neste estudo. Cada *primer* apresentado contém a fonte de origem e a temperatura de anelamento (°C) 79
- Tabela 3.** Panorama geral dos dados genéticos dos marcadores cloroplastidiais. pb = quantidade de pares de base; N = número de amostras amplificadas; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; k = proporção de sítios polimórficos..... 80
- Tabela 4.** Regiões geográficas referentes a cada grupo filogenético obtida pela análise do BAPS. Foram plotadas cores referentes a cada agrupamento e região geográfica..... 80
- Tabela 5.** Matriz de distância genética (distância-p) par-a-par calculada para os grupos filogenéticos. Cálculo é feito baseado na distância genética corrigida pelo modelo Tamura-Nei dentro dos grupos, respectivamente..... 80
- Tabela 6.** Análise de variância molecular (AMOVA), comparando as diferentes variações entre e dentro dos grupos filogeográficos. Fst: Índice de fixação total dos grupos..... .81
- Tabela 7.** Valores do índice de fixação (Fst). Estimados par-a-par entre os grupos filogenéticos ao nível $p > (0.05)$ 81
- Tabela 8.** Parâmetros genéticos calculados para cada grupo populacional, sendo: n = número de indivíduos. S = número de sítios segregantes; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; k = número de sítios polimórficos; *D* de Tajima e *F_s* de Fu = testes de desvio de neutralidade, os números em negrito representam os valores estatísticos significantes ($p < 0.05$ para *D* de Tajima e $p \leq 0.02$ para *F_s* de Fu)..... 81

1. INTRODUÇÃO

Os *inselbergs* são afloramentos rochosos caracterizados muitas vezes como ilhas biogeográficas que conferem graus de isolamento geográfico diferenciados às espécies de plantas que os habitam (POREMBSKI et al., 2000; BARBARÁ et al., 2007; PALMA-SILVA et al., 2011). O grau desse isolamento pode afetar de maneira significativa a diversidade genética das espécies (WRIGHT, 1943), impactando principalmente as espécies de ocorrência restrita a estas ambientes.

Pitcairnia azouryi Martinelli & Forzza é uma espécie de Bromeliaceae restrita a *inselbergs* da região sudeste do Brasil (MANHÃES et al., 2016). Um estudo genético realizado com a totalidade de populações conhecidas à época para a espécie (MANHÃES et al., 2019) revelou que a população de um dos extremos da distribuição geográfica da espécie era a mais divergente segundo as estimativas de estruturação populacional. No entanto, como os autores não abordaram aspectos evolutivos em uma escala histórica temporal, o entendimento sobre quais processos evolutivos poderiam estar atuantes e como as forças evolutivas dirigiram os padrões de diversidade genética encontrados não foram respondidos.

Este trabalho faz uso de uma abordagem evolutiva integrativa para investigar o papel dos fatores históricos e populacionais de *P. azouryi*. Inicialmente é apresentada a contextualização teórica com aspectos básicos do tema através de uma revisão bibliográfica meticulosa. Em um segundo momento, é apresentado o estudo que buscou investigar a dinâmica histórica evolutiva de *P. zouryi*, com base na estimativa dos tempos de divergência entre as populações e análises populacionais, esperamos responder às seguintes

questões: 1) Quais os mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação de *P. azouryi* com base nos padrões filogeográficos das populações encontrados?, 2) Os padrões estão em consonância com os trabalhos anteriores com plantas residentes de *inselbergs*? e por fim, c) Qual a relação das flutuações climáticas do Quaternário na diversificação das populações de *P. azouryi*?

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Filogeografia - um ramo da Biogeografia

Um dos propósitos mais elementares da biogeografia é estudar os padrões de distribuição das espécies. Esses padrões podem ser observados em múltiplas escalas temporais em relação aos parâmetros geográficos e processos ecológicos que podem ter impulsionado ao padrão atual de distribuição dos mesmos (LOMOLINO, 2005).

A Filogeografia é um ramo da biogeografia que estuda os princípios e os processos que governam a distribuição de espécies geneticamente relacionadas em uma escala espacial e temporal (AVISE, 2000). Os estudos filogeográficos utilizam atualmente uma abordagem multilocos que associa os dados de filogenia aos padrões de distribuição das espécies, a fim de reconstruir a história evolutiva de linhagens genealógicas no tempo e espaço (AVISE, 2009; HICKERSON et al., 2011). Este tipo de estudo é importante, pois torna possível avaliar processos evolutivos que possam ter resultado na estruturação populacional das espécies estudadas (AVISE, 2009).

Em contextos evolutivos, modelos de nicho ecológico (ENMs - *Ecological niche models*) também têm sido aliados com sucesso a filogeografia, permitindo

identificar áreas de estabilidade ambiental e potenciais implicações para a diversidade de espécies e diversidade genética (CARNAVAL et al., 2009; GRAHAM et al., 2010; WERNECK et al., 2012a), contribuindo para delimitações de espécies (RAXWORTHY et al., 2007; RISSLER, APODACA 2007), para suportar cenários demográficos. Outras implicações práticas desses estudos estão dentro de contextos ecológicos e evolutivos, principalmente fornecendo informações valiosas sobre os diferentes processos de diversificação da biota.

2.2. Floresta Atlântica: aspectos gerais e de biodiversidade

O continente sul-americano abriga uma das regiões de maior megadiversidade do planeta, a Floresta Atlântica, a qual originalmente cobria uma área de 1.315.460 km² e, atualmente, está reduzida em aproximadamente 7-33% de sua área original (MYERS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009; REZENDE et al., 2018). Estende-se continuamente na porção leste do território brasileiro, incluindo ainda Misiones na Argentina e o leste do Paraguai (GALINDO-LEAL, CÂMARA 2005). Além disso, é circundada pela diagonal seca da América do Sul (composta pelas áreas abertas da Caatinga, Cerrado e Chaco) configurando uma ilha florestal isolada na porção leste do continente sul Americano (AB'SABER, 1977).

A biota da Floresta Atlântica engloba entre 1 a 8% de toda biodiversidade do planeta (SILVA, CASTELETI, 2005). O elevado número de espécies endêmicas e a diversidade de plantas vasculares indica que este domínio fitogeográfico figura dentre àqueles que apresentam as mais altas do mundo (MARTINELLI et al., 2008). Entre os gêneros de angiospermas, 159 são endêmicos da Floresta Atlântica e aproximadamente metade desses são

monotípicos (STEHMANN et al., 2009). Ademais, alguns grupos de angiospermas apresentam grande representatividade neste domínio, como por exemplo a família Bromeliaceae (MARTINELLI et al., 2008; BFG, 2020).

A Floresta Atlântica é composta por diferentes formações florestais, tais como: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Decidual, Floresta Estacional Semidecidual, além de ecossistemas associados tais como as Formações Pioneiras (restingas), manguezais e os refúgios vegetacionais ou Campos de Altitudes (IBGE, 2012).

As diferentes fitofisionomias conferem ampla heterogeneidade, a qual é traduzida em uma alta biodiversidade (CNRBMA, 2020). É constituída por regiões arenosas ao nível do mar, assim como por áreas emersas em manchas de campos de altitude, sendo frequentemente encontrados acima de 2000 m (SAFFORD 1999, 2007).

No entanto, a despeito da conservação, esse domínio fitogeográfico tem sido drasticamente reduzido a fragmentos cada vez mais esparsos, uma vez que a pecuária e agricultura atingiram toda a extensão florestal (MARTINELLI et al., 2008; MITTERMEIER et al., 2011). O avanço antrópico sobre a área florestal ocorre conforme interesses econômicos e devido à expansão urbana, o que pode acarretar maior pressão sobre fitofisionomias específicas que se encontram nestas áreas. Por ser uma das florestas mais ameaçadas do mundo, a perda da biodiversidade pode trazer consequências diretas, tais como erosão genética, perda de ecossistemas, de populações e processos evolutivos fundamentais que fazem a manutenção da biodiversidade (GALINDO-LEAL, CÂMARA 2005). Assim, é de suma importância a delimitação de áreas prioritárias para a

conservação (MARTINELLI et al., 2008; MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2011).

A grande heterogeneidade observada pode ser explicada pelas variações dos gradientes latitudinal (de 5°S a 30°S) e altitudinal (ao nível do mar à cerca de 1700m) presentes (D'HORTA et al., 2011). Dessa forma, a heterogeneidade ambiental e o isolamento podem ter sido fatores preponderantes para a grande variedade de espécies endêmicas encontradas dentro do cenário de regiões megadiversas (MYERS et al., 2000).

O entendimento da megadiversidade na região tropical difere na eleição do mecanismo causador dos processos de especiação (COX, MOORE, 2010; PIANKA, 1966). Alguns autores defendem que a instabilidade dessa região (na qual incluem-se as Florestas tropicais pluviais) é a principal causa da megadiversidade, como por exemplo, a ocorrência de importantes eventos tectônicos (RIBEIRO, 2006; SAADI, 1993). Acredita-se, ainda, que constantes distúrbios locais nas comunidades e ecossistemas (CONNELL, 1978) possam ter levado a separação e diferenciação das linhagens e do nicho ecológico, resultando em especiação. Por outro lado, outros autores argumentam que a estabilidade da região tropical associada a um clima tropical característico com regimes de precipitação anual alta e poucas variações sazonais influenciou no surgimento de regiões megadiversas (D'HORTA et al., 2011). Um dos fatores preponderantes para este cenário pode ser devido às flutuações climáticas no Quaternário, no qual as regiões tropicais podem ter sofrido perturbações em menores escalas quando comparadas às regiões temperadas e menores variações de temperatura e precipitação anuais (MONTAGNINI, JORDAN,

2005), ou seja, tanto a flora quanto a fauna teriam mais tempo para se diversificarem.

Por serem regiões geologicamente mais antigas, as espécies tropicais foram acumulando pequenas adaptações que levaram aos inúmeros processos de especiação após determinado período (PIANKA, 1966) resultando no crescimento das taxas de mutação e seleção, provocando o surgimento de novas espécies de forma mais acelerada.

Em suma, o fenômeno da megadiversidade nas florestas tropicais impulsionou a criação de inúmeras hipóteses que tentam explicar a diversificação e riqueza das linhagens, seja relacionada à estabilidade ou à instabilidade. No entanto, Huggett (2004) explica que apenas um único processo não é capaz de explicar a origem da megadiversidade dos trópicos, pois os organismos podem responder de forma diferenciada. Para tanto, abordagens utilizadas em ecologia evolutiva e biogeografia molecular podem auxiliar na compreensão dos diferentes processos de diversificação responsáveis por gerar variações de riqueza de espécies em múltiplas escalas espaciais e temporais (RABOSKY, 2013).

2.3. *Inselbergs*: aspectos gerais e evolutivos

Os *inselbergs* são definidos como afloramentos rochosos graníticos ou gnáissico, isolados, originados de elementos da paisagem do pré-crambiano sobre escudos continentais cristalinos (POREMBSKI et al., 2010). Estas formações rochosas destacam-se pela heterogeneidade vegetacional e estrutural que apresentam na Floresta Atlântica. Apresentam condições

ambientais extremas, como altas temperaturas, solos pouco desenvolvidos ou ausentes e baixa retenção de água e exposição a ventos fortes (POREMBSKI, BARTHLOTT, 2000; DE PAULA et al., 2016; COUTO et al., 2017). Esses filtros ambientais condicionaram a formação de uma flora rica e endêmica, muito distinta da vegetação circundante com predominância de espécies xéricas (POREMBSKI, 2007). Por causa de sua natureza geográfica disjunta, os *inselbergs* são frequentemente comparados às ilhas oceânicas, já que a maioria deles exibe um forte isolamento ecológico marcado por área circundante (POREMBSKI et al., 2000; BURKE, 2003).

De acordo com Safford e Martinelli (2000), os *inselbergs* englobam toda a costa leste do Brasil, inseridos desde o semiárido nordestino até os altiplanos nebulares do Rio Grande do Sul. Muito embora esses afloramentos em sua maioria graníticos sejam comuns nas paisagens brasileiras, estudos acerca da flora e seus aspectos históricos são ainda incipientes diante de sua importância (PALMA-SILVA et al., 2011; HMELJEVSKI et al., 2017; DE PAULA et al., 2017). Desta forma, investigações sobre a história evolutiva, sistemática e ecologia são fundamentais para auxiliar no entendimento da diversificação frente a respostas a flutuações climáticas pretéritas.

No território brasileiro, a maior concentração de *inselbergs* está na região nordeste, no domínio da Caatinga (AB'SÁBER, 1967), ainda que exista uma grande concentração desses afloramentos rochosos contemplada dentro da Mata Atlântica, na região sudeste, principalmente nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (DE PAULA et al., 2016). A região sudeste, no entanto, é considerada um dos três *hotspots* mundiais de diversidade de plantas

em *inselberg*, juntamente com Madagascar e sudoeste da Austrália (POREMBSKI, 2007).

A grande maioria dos *inselbergs* que emergem no sudeste do Brasil, localizam-se entre os Estados do Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), em partes do sul da Bahia, sudeste de Minas Gerais (MG) e em algumas regiões do estado de São Paulo (SP) (referência). O conjunto de características únicas, associados a uma biota dinâmica e variável resultou nas grandes diferenças observadas nos *inselbergs* do sudeste brasileiro (SAFFORD, MARTINELLI, 2000). Essa região central compreende uma fitogeografia específica da Floresta Atlântica e, recentemente, baseada na flora amplamente diversificada da família Bromeliaceae foi denominada como “*Sugar Loaf Land*” (DE PAULA et al., 2016; 2020). Para estes *inselbergs*, foram listadas registradas 548 espécies de plantas vasculares, atribuídas a 69 famílias e 212 gêneros, com predomínio das famílias Bromeliaceae, Orchidaceae e Asteraceae (DE PAULA et al., 2020). Entre as Bromeliaceae, os gêneros *Alcantarea*, *Orthophytum*, *Pitcairnia*, *Stigmatodon* e *Tillandsia* dominam a paisagem de *inselbergs* no Brasil (de PAULA et al., 2016; 2020).

Entre os levantamentos florísticos realizados por Porembski e Barthlott (2000), foram contabilizadas 57 famílias e 3.500 espécies de angiospermas nos *inselbergs*. Destas famílias, destacam-se pelas características epífitas e de adaptação, Orchidaceae e Bromeliaceae, sendo essa última contendo gêneros (*Alcantarea*, *Encholirium*, *Orthophytum*, *Pitcairnia*, *Tillandsia* e *Vriesea*) que dominam a paisagem de *inselbergs* no Brasil (DE PAULA et al., 2016).

Algumas investigações sobre a história evolutiva de algumas espécies de bromélias demonstraram um reduzido fluxo gênico intraespecífico entre

inselbergs, caracterizando-as como ilhas e elevado grau de isolamento ecológico (BARBARÁ et al., 2007; PALMA-SILVA et al., 2011; HMELJEVSKI et al., 2017; MOTA et al., 2020). Sabe-se que a interrupção ao fluxo gênico está associada, entre outros fatores, ao tamanho de área habitada por espécie em comparação com a distância de migração dos indivíduos, promovendo um isolamento por distância ou geográfico (WRIGHT, 1943). O modelo *stepping stone* (isolamento por distância), considera que o grau de isolamento pode interferir de maneira significativa na diferenciação genética, uma vez que populações conferem uma redução gradual na similaridade genética devido ao aumento da distância geográfica e restrição da dispersão (KIMURA, WEISS, 1964; HELLBERG et al., 2002). Dessa forma, as estimativas de fluxo gênico para populações sofrendo processos de *stepping stone*, serão altas em populações mais próximas e reduzidas nas mais distantes (HELLBERG et al., 2002).

O endemismo registrado nos *inselbergs* reflete uma evolução mais antiga e longa, com evidências paleobotânicas, sugerindo que afloramentos rochosos cobriram os cumes das montanhas do sudeste do Brasil desde o Pleistoceno (BEHLING, 1997; SAFFORD, 1999). Alguns autores também defendem que *inselbergs* podem ter atuado como refúgio para espécies xerófilas ou adaptadas ao frio durante ciclos glaciais, no Pleistoceno do Quaternário (SPEZIALE, EZCURRA, 2012; SCARANO, 2002). Quando um clima mais seco favoreceu a expansão das espécies adaptadas a tal condição no leste do Brasil (BEHLING, 2002; LEDRU et al., 2007; CARNAVAL, MORITZ, 2008). Por outro lado, durante os períodos interglaciais, no Pleistoceno do Quaternário, ocorreram expansões das florestas úmidas e retração da vegetação xérica, que permaneceu em topos de morros de elevadas altitudes, onde as condições edafoclimáticas não eram

propícias para o desenvolvimento de fisionomias florestais, formando os campos de altitude e os chamados *inselbergs* (BEHLING, 2002).

Safford e Martinelli (2000) listam quatro razões que podem refletir no grande número de espécies registradas nos *inselbergs* do Brasil: 1) sucessivos ciclos de expansão e contração vegetacional (e conseqüentemente a sua flora rupícola) em resposta a flutuações climáticas glaciais durante o Pleistoceno, no Quaternário, que favoreceu a diversificação por especiação alopátrica. Somado a isso, as savanas Sul-Americanas teriam atingido sua extensão máxima durante o Último Máximo Glacial (UMG), com conexões entre blocos savânicos localizados ao norte e ao sul da Amazônia (WEBB, 1991); 2) a variação do gradiente altitudinal do Sudeste Brasileiro levando a uma heterogeneidade ambiental entre *inselbergs* próximos, cujas diferenças únicas pode acarretar divergência genética dentro de espécies; 3) prevalência das famílias Bromeliaceae e Velloziaceae, as quais são formadas em parte por táxons capazes de alterar facultativamente de habitats epífitos para rupícolas e saxícolas; e por fim 4) a predominância de encostas estéreis, favorecendo assim, uma multiplicidade de locais para colonização e evolução local.

2.4. Explicando a diversificação da biota por hipóteses biogeográficas

A elevada diversidade biológica no contexto da biogeografia, observada em regiões tropicais, é um fator atuante para investigações sobre quais os processos históricos e evolutivos podem estar envolvidos em originar e manter a diversidade da biota. Estudos filogeográficos, paleoclimáticos e geológicos abarcam múltiplas metodologias que, até então, não possibilitavam quantificar de maneira satisfatória e robusta essa diversidade. Existem diferentes hipóteses

debatidas na literatura (a exemplo, barreiras riverinas, hipóteses de refúgios, gradientes ecológicos) capazes de explicar os possíveis processos responsáveis por gerar padrões de diversidade vistos atualmente. Porém, destaca-se ainda, que a diversificação das espécies no Neotrópico não pode ser explicada por apenas um único modelo de vicariância ou de mudanças ambientais (HOORN et al., 2010). E a biodiversidade da Floresta Atlântica parece ser moldada em uma história complexa envolvendo não somente uma hipótese de diversificação (CARNAVAL et al., 2009; D' HORTA et al., 2011). Todas as hipóteses sugeridas foram revisadas dentro de um contexto coalescente por Leite e Rogers (2013), onde estes sugerem novas perspectivas filogenéticas, através de padrões genéticos para a análise das hipóteses de diversificação.

2.4.1. Barreiras riverinas

Uma hipótese bastante conhecida é a “barreiras de rios”, proposta inicialmente por Wallace (1852), sugerindo que a geração da diversidade das espécies ocorreu após surgimento dos grandes rios como barreiras vicariantes (barreiras geográficas primárias) durante o Mioceno tardio (Figura 2). Muitos estudos têm confirmado essa hipótese para uma gama de grupos taxonômicos, a exemplo da diversificação de primatas do gênero *Callithrix* (ROOSMALEN et al., 1998) e *Saguinus* (PERES et al., 1996), além de aves de diversas famílias (CLUTTON-BROCK, 1992; HAFFER, 1992; RIBAS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; FERNANDES et al., 2014). Ribas et al. (2012), revelaram através de modelos biogeográficos e datação molecular a influência do surgimento dos grandes rios Amazônicos na especiação no gênero de aves *Psophia*, destacando a importância de estimativas de tempos de divergência genética

para estudos que envolvem biogeografia e especiação. Além disso, morfoestruturas como cadeias montanhosas (CHAPMAN, 1917; KATTAN et al., 2016) podem atuar também como barreiras primárias, impedido o fluxo gênico entre as populações, permitindo a diferenciação e, conseqüentemente, diversificação da biota (PATTON et al., 1994; CABANNE et al., 2008).

Dentro do contexto da Floresta Atlântica, foram verificadas evidências de contribuição dos rios atuando como barreiras ao fluxo gênico entre linhagens geneticamente diferentes, a exemplo do rio Doce (MARTINS, 2011), o rio São Francisco (CABANNE et al., 2008), o rio Paranapanema (PIRES et al., 2011) e o rio Jequitinhonha (BATALHA-FILHO, 2012). Ribeiro (2006) utilizou análises biogeográficas e inferiu uma datação mais antiga para o rio Doce, em relação às divergências encontradas, sendo um possível caso de barreira secundária e, ainda, é considerado um local de quebra genética em diversos organismos que ocorrem do norte ao sul das margens (COSTA, 2003, FOUQUET et al., 2012). Ademais, as regiões norte e sul diferenciam quanto a sua composição florísticas em relação a táxons restritos a cada margem oposta (CARNAVAL et al., 2014).

2.4.2. Hipótese de refúgios

Hipóteses como a dos refúgios Pleistocênicos proposta por Haffer (1969) implicam que as espécies se diversificaram por especiação alopátrica, devido a sucessivos ciclos de expansão e contração vegetacional em resposta aos ciclos climáticos glaciais durante o Pleistoceno, nos quais as savanas Sul-Americanas teriam atingido sua extensão máxima durante o UMG, com conexões entre blocos savânicos localizados ao norte e ao sul da Amazônia (WEBB, 1991) (Figura 1).

Essencialmente, a floresta se contraiu em fragmentos (refúgios), em períodos muito secos e frios do UMG, ocasionando uma redução e a fragmentação das populações das espécies associadas com a vegetação por isolamento genético. Contrariamente, as savanas se expandiam nesse mesmo período. Já no período Último Máximo Interglacial (UMI), quando o clima era mais úmido, as florestas se expandiam através de um contato secundário entre as populações.

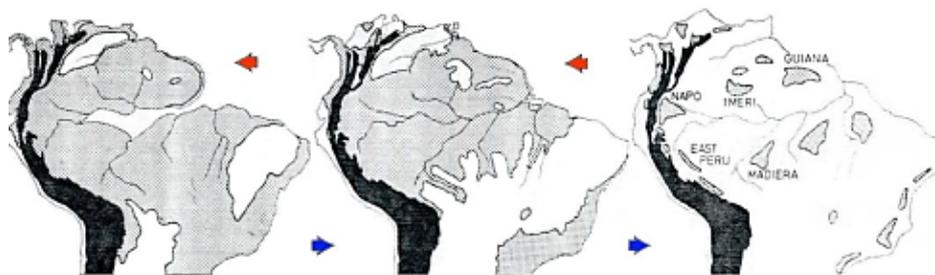


Figura 1. Teoria de Refúgios Pleistocenos proposto por Haffer (1969) ao longo das flutuações climáticas. Regiões cinzas significam as áreas ocupadas por florestas tropicais; regiões brancas marcam a ocupação dos blocos savânicos. Seta azul: demonstra a escala temporal de redução da Floresta Atlântica em refúgios quando o clima estava mais seco e frio do Pleistoceno; Seta vermelha: demonstra a escala temporal de expansão dos refúgios florestais quando o clima retornou como mais quente e úmido no mesmo período.

Além disso, Carnaval e Moritz (2008), reconhecem regiões de alta adequabilidade (a região norte, ao norte do Rio São Francisco e a região central, entre os Rios São Francisco e o Doce), ou seja, as florestas mantiveram-se úmidas e estáveis, constituindo-se refúgios florestais no UMI. Porém, muito se tem debatido sobre a validação dessa teoria, pois uma série de trabalhos (COLINVAUX et al., 2000; MAYLE et al., 2004; WERNECK et al., 2012b) não indicam que o UGM foi caracterizado por ampla distribuição de savanas.

2.4.3. Hipótese de gradientes ecológicos

A hipótese de gradientes ecológicos propõe que espécies teriam se diferenciado ao longo de mudanças ambientais, em um gradiente ecológico na qual promove seleção divergente, mesmo na presença de fluxo gênico (ENDLER, 1977).

Segundo essa hipótese, as áreas de transição ecológica seriam pontos de encontro entre táxons irmãos ou outros grupos genéticos (LARA et al., 2005). Apesar de, nesse contexto, não haver isolamento físico (vicariância) ao fluxo gênico, as populações teriam se adaptado às características seletivas de um ambiente razoavelmente uniforme, que varia em clina, levando à especiação parapátrica (ENDLER, 1982).

2.5. A família Bromeliaceae

Dentre as famílias de plantas com grande representatividade nos *inselbergs*, destaca-se a Bromeliaceae (De PAULA et al., 2016, 2020; FRAGA et al., 2019; COUTO et al., 2017). Essa família configura entre as dez famílias de angiospermas com maior riqueza de táxons para a flora brasileira (MARTINELLI et al., 2008; FRAGA et al., 2019; BFG 2020), abrigando aproximadamente 77 gêneros e 3630 espécies (GOUDA, BUTCHER & GOUDA, continuamente atualizado) distribuídas quase que exclusivamente no Neotrópico (SMITH, DOWNS 1974; GIVNISH et al., 2011). São reconhecidos para a família três grandes centros de diversidade: a Floresta Atlântica Brasileira; as encostas andinas do Peru, Colômbia e Equador; México e América Central (SMITH, DOWNS, 1974; ZIZKA et al., 2009). A única exceção ao padrão de distribuição

exclusivamente americana é a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr, localizada na região da costa da Guiné, na África Ocidental (BEZING, 2000, COSTA, 2002; BFG, 2020).

Os representantes de Bromeliaceae apresentam uma plasticidade fenotípica das mais variadas formas, desenvolvendo-se bem nos mais diferentes ambientes, e em quase todos os ecossistemas americanos. Isso engloba desde áreas ao nível do mar até locais com grandes altitudes (com cerca de 4.000 m), regiões com temperaturas elevadas e lugares com a temperatura próxima de zero, como os cumes das serras (SMITH, DOWNS, 1974; 1979). Por exemplo, as bromélias xeromórficas do gênero *Tillandsia* detém características particulares resistentes a seca, tais como, densa camada de tricomas peltados nas folhas (MALES, GRIFFTHS, 2017).

Estima-se que cerca de 50% das espécies e 73% dos gêneros de bromélias ocorram em todo o território brasileiro (BFG, 2020) englobando diferentes domínios fitogeográficos como a Caatinga, a Restinga, a Floresta Amazônica, a Floresta Atlântica, o Cerrado e até os Campos Rupestres (LEME, 1993; BFG, 2020). Somente no domínio da Mata Atlântica, são registradas 943 espécies de bromélias, distribuídas em 35 gêneros (BFG, 2020)

Com o avanço do processo de extrativismo ilegal para fins comerciais, queimadas, exploração de rochas ornamentais, dentre outros, têm contribuído para a destruição da vegetação natural desses ambientes únicos (COFFANI-NUNES, 2002; MARTINELLI et al., 2008; FRAGA et al., 2019). Somado a isso, em diversas regiões do Brasil, esses afloramentos rochosos não são considerados áreas prioritárias para conservação e não possui legislação específica que garantam legalmente sua preservação. Além disso, com a

promulgação do novo Código Florestal (Lei 12.651 de 25 de maio de 2012) corre-se o risco de uma redução ainda maior do tamanho das populações naturais sendo sujeitas à erosão genética. Dessa forma, investigar as forças que dirigem os processos evolutivos e de estruturação populacional ao longo do tempo e obter estimativas de diversidade genética em populações naturais tornam-se fundamentais para endossar estratégias de conservação *in situ*.

Fraga et al. (2019) identificaram o estado do Espírito Santo como o segundo maior em riqueza de espécies e endemismos para a família na Floresta Atlântica, e listaram a ocorrência de 323 espécies neste domínio fitogeográfico, sendo 143 exclusivas desta formação. Para a região Sul do Espírito Santo, novos táxons vêm sendo descritos tais como *Pitcairnia azouryi* Martinelli & Forzza registrada para o município de Cachoeiro de Itapemirim (MARTINELLI, FORZZA 2006), ; *Pitcairnia abyssicola* Leme & L. Kollmann, *Neoregelia dayvidiana* Leme & A. P. Fontana e *Vriesea mimosoensis* D.R. Couto, Kessous & A.F. Costa, descritas para a região de Pedra dos Pontões, no município de Mimoso do Sul (LEME et al., 2009; COUTO et al., 2010); *Alcantarea patriae* Versieux & Wand. (VERSIEUX, WANDERLEY, 2007) para o município de Jerônimo Monteiro; *Nidularium alegrense* Leme & Kollmann, para o município de Alegre (LEME et al., 2010a) e *Neoregelia dactyloflammas* Leme & L. Kollmann, para a região de Muqui (LEME, KOLLMANN, 2011).

Apesar da grande diversidade encontrada no estado do Espírito Santo, Fraga et al. (2019) apontaram Bromeliaceae como a segunda família com maior número de táxons ameaçados no estado. A expansão urbana é um dos fatores que mais exerce pressão sobre as áreas cobertas por vegetação, levando à degradação das florestas e à perda de habitats, resultando em remanescentes

florestais fragmentados. Os processos de migração e colonização de novas áreas essenciais para a manutenção das populações em longo prazo são também prejudicados, podendo acarretar em alterações nas mudanças na composição e abundância de espécies, ou mesmo à perda de processos naturais das comunidades (TABARELLI et al., 2005).

2.5.1. Sistemática e evolução de Bromeliaceae

Tradicionalmente, a família foi dividida em três subfamílias: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (SMITH, DOWNS 1974; 1979). No entanto, Givnish et al. (2011) utilizando oito marcadores cloroplastidiais confirmaram filogeneticamente uma nova classificação e o reconhecimento dos antigos grupos parafiléticos de Pitcairnioideae em novas subfamílias, totalizando oito subfamílias: Brochinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Bromelioideae, Puyoideae e Pitcairnioideae. Ademais, a diversificação mais recente das linhagens modernas de Bromeliaceae se configurou a 19 Ma no Escudo das Guianas ao norte da América do Sul (GIVNISH et al., 2007; GIVNISH et al., 2011).

Dentro das subfamílias, destaca-se Pitcairnioideae, que abriga gêneros como *Dyckia* Schult. & Schult.f. (ca. 168 spp.), *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (29 spp.), *Fosterella* L.B.Sm. (31 spp.), *Deuterocohnia* Mez (incluindo *Abromeitiella*, (27 spp.) e *Pitcairnia* L'Hér. (~405 spp.) (GOUDA, BUTCHER & GOUDA, continuamente atualizado). A subfamília Pitcairnioideae se distingue das demais subfamílias por apresentar morfologia com folhas com margens quase sempre espinoscentes, ovário súpero ou semi-ífero, frutos do tipo

cápsulas deiscentes e as sementes apresentam geralmente apêndices não plumosos (SMITH, DOWNS, 1974).

Ainda, de acordo com as hipóteses evolutivas obtidas por Givnish et al. (2007, 2011), os gêneros *Pitcairnia* e *Fosterella* compartilham algumas características anatômicas foliares e morfologia mais métrica e de fotossíntese C3 (SANTOS-SILVA et al., 2013). Divergiram-se anteriormente do “clado xérico” com metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), *Dyckia*, *Encholirium* e *Deuterocohnia*, esses últimos, invadiram novos ambientes, como florestas pluviais, topo de árvores e ambientes xéricos ocupando majoritariamente ambientes de clima estacional na região denominada arco-seco (Caatinga, Cerrado e Chaco) (PRADO, GIBBS, 1993). Além disso, Pitcairnioideae data do surgimento mais basal a 13,4 Ma nos Escudos das Guianas em direção ao Norte dos Andes (GIVNISH et al., 2011) sendo *Pitcairnia* irmã do restante da subfamília do clado xérico, e irmã de *Fosterella* (CRAYN et al., 2004, REX et al., 2009, GIVNISH et al., 2011, SCHUBERT, 2017) (Figura 2).

Bromeliad 8-locus chronogram
bars indicate ± 1 s. d. of node age

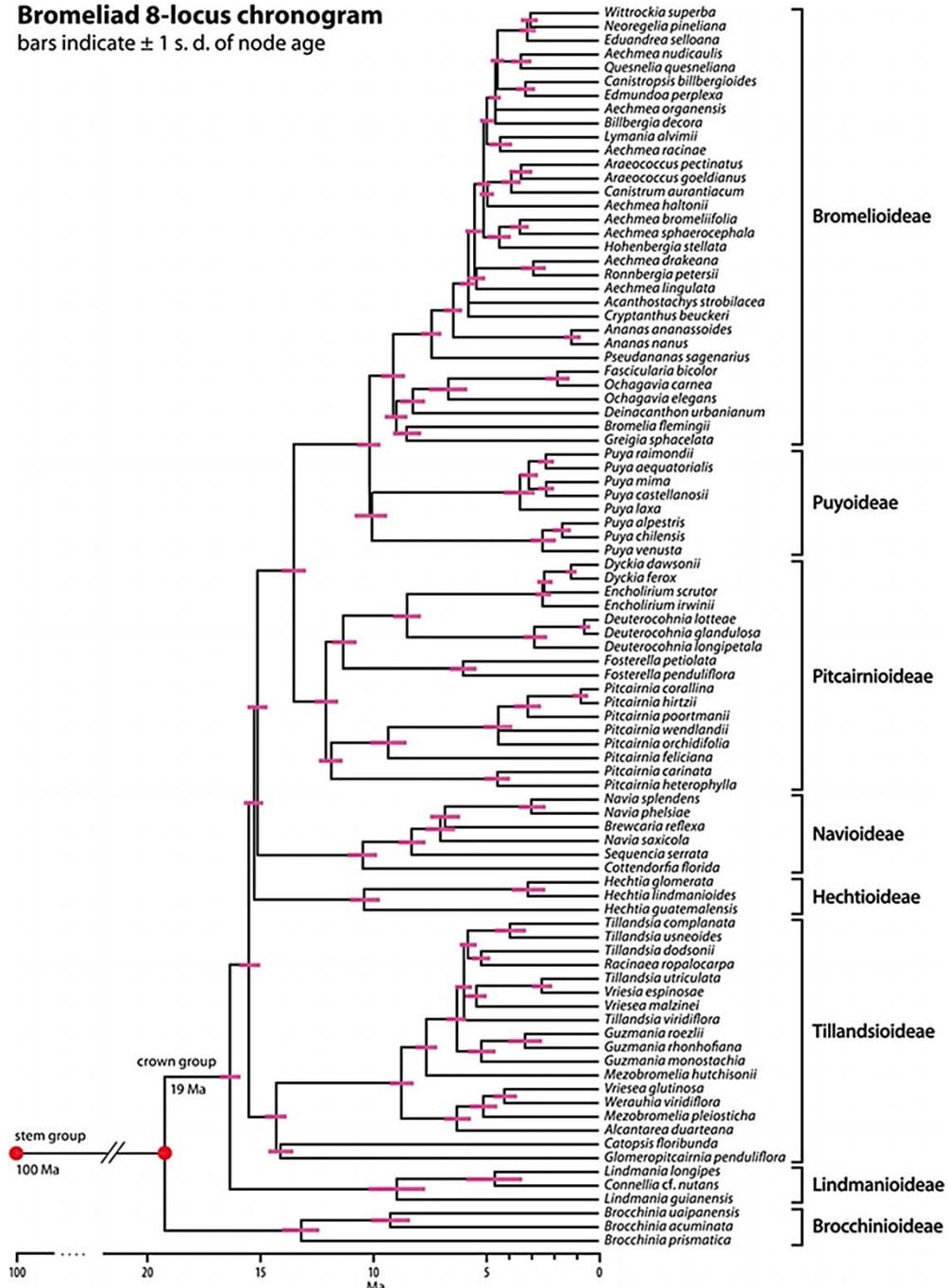


Figura 2. Cronograma cruzado com as probabilidades verossimilhança para evolução de bromélias com base na filogenia de máxima verossimilhança dos oito marcadores. Cada barra indica o desvio padrão em torno dos tempos de divergência estimada de cada nó correspondente (GIVNISH et al., 2011).

2.5.2. O gênero *Pitcairnia* L'Her

O maior gênero de Pitcairnioideae e o mais amplamente distribuído é *Pitcairnia* com cerca de 410 espécies (GOUDA, BUTCHER & GOUDA,

continuamente atualizado), distribuídas desde o México, América Central, Antilhas e quase toda a América do Sul totaliza a maior riqueza de espécies na região dos Andes (LUTHER, 2008; FORZZA, 2015). De acordo com a sua história evolutiva tem seu surgimento a aproximadamente 13.4 Ma e origem ancestral nos Escudos das Guianas da Venezuela (GIVNISH et al. 2007, 2011).

O gênero *Pitcairnia* caracteriza-se taxonomicamente pelas inflorescências em forma de espiga, racemos ou panículas. Flores bissexuadas, longopediceladas a sésseis; sépalas do tipo livres e convolutas; pétalas livres, vistosas, amplas gamas de cores, longas; estames geralmente exsertos; ovário variando de súpero a semi-ínfero; óvulos numerosos, apendiculados ou raramente sem apêndices (SMITH, DOWNS, 1974).

No Brasil, 54 espécies de *Pitcairnia* são contabilizadas (SARAIVA & FORZZA 2020) e os estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo são considerados como centros em diversidade de espécies do gênero *Pitcairnia* (MARTINELLI, FORZZA, 2006, FORZZA et al., 2013). A distribuição geográfica das espécies de *Pitcairnia* geralmente está relacionada com as características edáficas condicionadas por solos areno-pedregosos ou afloramentos rochosos, pelas quais seus representantes habitam esse substrato (FORZZA et al., 2013).

2.5.3. Espécie taxonômica alvo: *P. azouryi*

Pitcairnia azouryi (Figura 3) Martinelli & Forzza é uma bromélia com distribuição geográfica global disjunta e restrita em afloramentos rochosos do tipo *inselbergs* localizados nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Manhães et al. 2016). Ademais, confere características morfológicas que a diferencia das demais espécies do gênero no Brasil por apresentar inflorescência

com pétalas reflexas após fecundação, lâmina foliar do tipo decídua com persistência das bainhas aculeadas e formação de grandes bulbos na base (MARTINELLI, FORZZA, 2006, LEME et al., 2010b) (Figura 3).



Figura 3. *P. azouryi* em seu habitat natural: (A - B) espécimes no início da floração e distribuição em manchas de vegetação rupícola (Fonte: Arquivo pessoal)

Pouco se conhece sobre a biologia da planta desde a revisão taxonômica de Martinelli e Forzza (2006). Leme et al. (2010b), realizando expedições ao longo dos *inselbergs* do Rio de Janeiro e Espírito Santo descreveram um possível complexo natural de espécies endêmicas crípticas constituído por: *P. azouryi*, *P. barbatostigma* Leme & A. P. Fontana, *P. glauca* Leme & A. P. Fontana e *P. diversifolia* Leme & A. P. Fontana pelo reconhecimento através de um conjunto de diferenças sutis quanto a morfologia e ecologia.

Recentemente, Manhães et al. (2019), pontuaram aspectos genéticos de diversidade genética e de estruturação populacional para *P. azouryi* utilizando marcadores SSR, e ainda, descobriram e incorporaram outras populações em outras localidades, aumentando de forma significativa a amplitude de ocorrência dessa espécie (Figura 4).

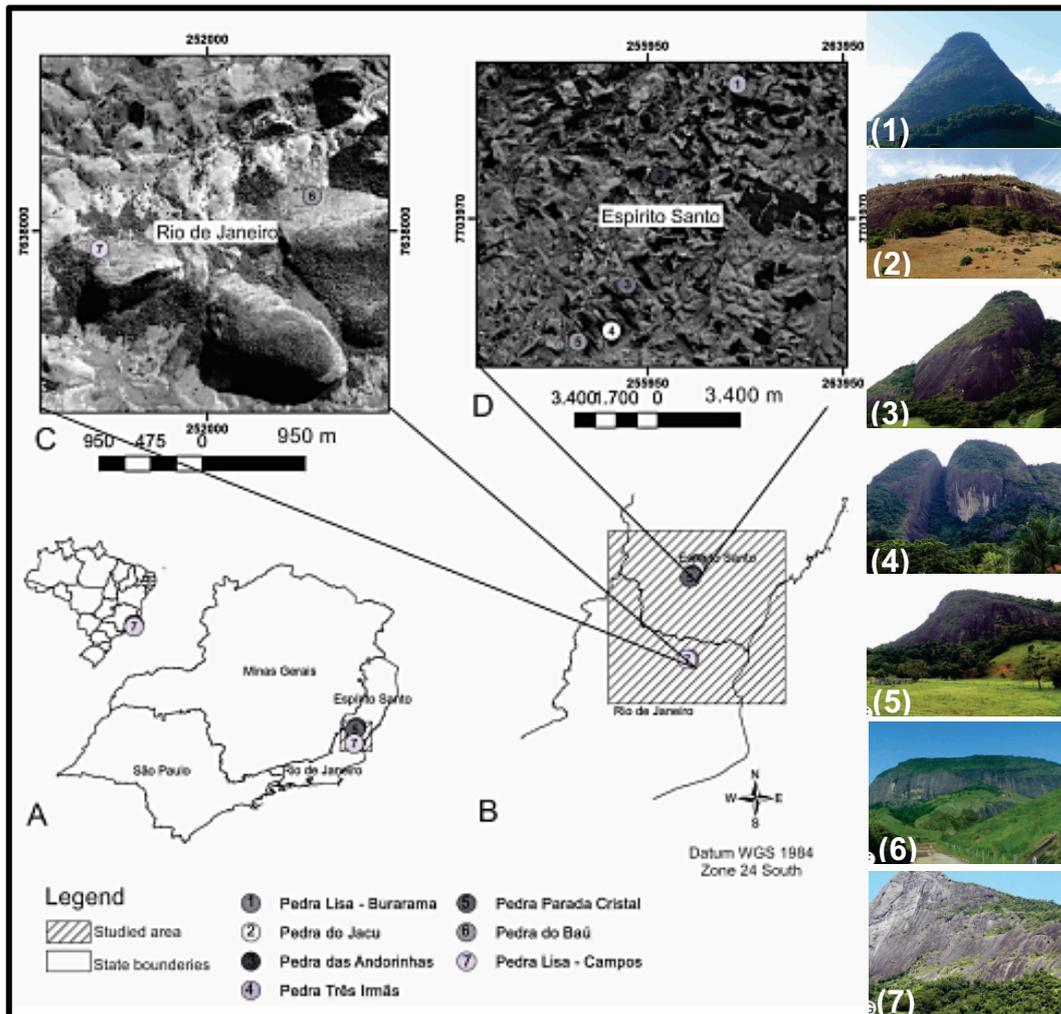


Figura 4. Distribuição geográfica das sete localidades de ocorrência de *P. azouryi*: (1). Pedra Lisa-Burarama; (2) Pedra do Jacú; (3) Pedra das Andorinhas; (4) Pedra Três Irmãs; (5) Pedra Parada Cristal; (6) Pedra do Baú e (7) Pedra Lisa-Campos. (Extraído e adaptado de Manhães et al., 2016).

Muito embora tenha havido um progresso recente com o estudo de genética da conservação realizado por Manhães et al. (2019), é evidente que há muito ainda a ser entendido sobre os processos evolutivos que possam estar envolvidos na distribuição restrita e disjunta em *inselbergs* de ocorrência *P. azouryi*. Haja vista, exemplos de padrões de distribuição restrita a *inselbergs* (PALMA-SILVA et al., 2011, BOISSELIER-DUBAYLE et al., 2010) a espécie *P. azouryi* constitui um modelo biológico excelente para se investigar forças que

dirigem os processos evolutivos e de estruturação populacional em *inselbergs* da costa leste da Floresta Atlântica.

2.6. Marcador cloroplastidial (cpDNA): implicações filogeográficas para a evolução

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998). Conferem diversas vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais. Exibem neutralidade fenotípica, podendo ser herdados co-dominantemente, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, e por fim, podem ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (TANKSLEY, 1983, FERREIRA, GRATTAPAGLIA 1998, ADHIKARI et al., 2017).

Kumar et al. (2009) listaram algumas propriedades que devem ser levadas em consideração na escolha de um marcador ideal: natureza altamente polimórfica (muito investigada em estudos de diversidade genética); herança codominante (diferenciação entre homozigotos dominantes e heterozigotos em organismos diploides); alta cobertura do genoma (distribuição uniforme ao longo do genoma); comportamento neutro e seletivo; acessível quanto à disponibilidade (deve ser fácil, rápido e barato para detectar); ensaios fáceis e com rapidez e por fim, alta reprodutibilidade.

Nos últimos anos, avanços em tecnologia e o conhecimento sobre sequências genéticas contribuíram significativamente para análises do genoma em diferentes organismos e têm sido bem documentados na literatura a utilização destas análises em estudos de genética da conservação (CAVALLARI

et al., 2006, DOMINGUES et al., 2011, VESCO et al., 2011). Um dos requisitos relevantes para o estudo filogeográfico é a escolha do marcador molecular a ser utilizado. Atualmente, os marcadores moleculares baseados em sequência de nucleotídeos de DNA detectam diferenças em regiões como deleções, inserções, substituições em estudos intra e inter-populacional tem tido alta popularidade, devido a características biológicas e técnicas que as tornam ideais para estudos ecológicos e evolutivos. Nos estudos filogeográficos de plantas, de modo geral, os microssatélites (SSR) e as sequências cloroplastidiais (cpDNA) são os marcadores mais utilizados.

O DNA cloroplastidial (cpDNA) possui também uma taxa de mutação menos frequente que a observada para o genoma nuclear (nDNA), tanto de plantas quanto de animais, e menos frequente ainda quando comparado com o DNA mitocondrial de animais (taxa de evolução rápida) (NAHUM, 2001). Esse marcador é ideal para detectar eventos demográficos antigos (ENNOS et al., 1999). Dessa forma, o genoma do cloroplasto é importante para estudos de padrões históricos de fluxo gênico, relações filogenéticas entre populações, reconstrução das rotas de dispersão e colonização de espécies de plantas (ENNOS et al., 1999, LI et al., 2002, CARVERS et al., 2003). Muito embora o genoma mitocondrial (mtDNA) de plantas tenha características parecidas ao do genoma do cloroplasto (cpDNA), e por possuir uma taxa de substituição lenta e herança uni-parental, ele não é muito utilizado devido a taxa de mutação ser bem menor do que o cpDNA, tanto de substituições quanto de inserções e deleções (WOLFE et al., 1987, DUMOLIN-LAPÈGUE et al., 1997). Além disso, o mtDNA confere grande variação em tamanho do genoma, no rearranjo dos genes e sofre

frequentes recombinações (PROVAN, 1999). Dessa forma, o mtDNA de plantas é muito menos estudado que o cpDNA (DUMOLINLAPÈGUE et al., 1997).

O cpDNA é caracterizado por ser um genoma conservado, com baixa ou ausente taxa de recombinação, baixos níveis de substituição de nucleotídeos, herança predominantemente uniparental (o que permite estudar o fluxo gênico via sementes, por exemplo) e tempos de coalescência curtos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA 1998). Estudos filogeográficos que envolvam mais marcadores de sequências (multilocos) permitem ter um maior acesso ao genoma juntamente com metodologias coalescentes que inferem vários loci, tornando possível analisar um grande conjunto de dados e obter uma melhor resolução filogeográfica entre as populações (KNOWLES, MADDISON, 2002). Ademais, estimativas com dados multilocos concatenados, conferem ainda uma elevada acurácia na divergência histórica interpopulacional (MADDISON, KNOWLES, 2006, EDWARDS et al., 2007, KUBATKO, DEGNAN, 2007; HELED, DRUMMOND, 2010). Estudos de simulação têm mostrado que três loci concatenados são suficientes para obter uma árvore de espécie com alta acurácia e tempos de divergência satisfatórios (MADDISON, KNOWLES, 2006; MCCORMACK et al., 2009; HELED, DRUMMOND, 2010).

3. CONCLUSÃO

Nossa revisão bibliográfica contextualiza informações básicas sobre os principais aspectos a serem abordados no capítulo I, para um melhor entendimento e compreensão da história evolutiva das populações da bromeliaceae *P. azouryi* na Floresta Atlântica.

4. REFERENCIAS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. **Geomorfologia**, v.53, p.1-23, 1977.
- ADHIKARI, S.; SAHA, S.; BISWAS, A.; RANA, T. S.; BANDYOPADHYAY, T. K.; GHOSH, P. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **Nucleus**, v. 60, p. 283–297, 2017.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3-15, 2009.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, 2000.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v.16, p.3759–3767, 2007.
- BATALHA-FILHO, H. Padrões e processos de diversificação em aves da Amazônia e da Mata Atlântica. Tese de doutoramento. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2012.
- BEHLING, H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). **Rev. Palaeobot. Palynol**, v. 97, p. 109–121, 1997.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 177, p. 19-27, 2002.
- BENZING, D. H., **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. London: Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 590, 2000.
- BOISSELIER-DUBAYLE, M. C.; LEBLOIS, R.; SAMADI, S.; LAMBOURDIÈRE, J.; SARTHOU, C. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on *inselbergs* in French Guiana a test of the forest refuge hypothesis. **Ecography**, v. 33, p. 175-184, 2010.
- BURKE, A. *Inselbergs* in a changing world – global trends. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 375–383, 2003.
- CABANNE, G. S.; D' HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and

- systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 760-77, 2008.
- CARNAVAL, A. C. et al. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proceedings. Biological sciences**, v. 281, p.1461, 2014.
- CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785 – 789, 2009.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **J Biogeogr**, v 35, p.1187-1201, 2008.
- CARVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1451-1460, 2003
- CAVALLARI, M. M.; FORZZA, R. C.; VEASEY, E. A.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, Detected using RAPD markers. **Biodiversity And Conservation**, v.15, p. 4357-4373, 2006.
- CHAPMAN, F. M. The distribution of bird-life in Colombia: a contribution to a biological survey of South America. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 36, p. 1–729, 1917.
- COFFANI-NUNES J. V. **Bromélias** pp. 119-132 In: simões, I. L. & lino, c.f. (eds.) Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais. São Paulo. 2002.
- COLINVAUX, P. A.; DE OLIVEIRA, P. E.; BUSH, M. B. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. **Quaternary Science Reviews**, v. 19, p. 141-169, 2000.
- CONNELL, J. H. Diversity in tropical rain forests and coral reefs - high diversity of trees and corals is maintained only in a non-equilibrium state. **Science**, v. 199, p. 1302-1310, 1978.
- CONSELHO NACIONAL RESERVA DA BIOSFERA DA MATA (ATLÂNTICA). Anuário Mata Atlântica. Disponível em: Acesso em: 3 març. 2020.

- COSTA, A. F. **Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae)**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71-86, 2003.
- COUTO, D. R.; FRANCISCO, T. M.; MANHÃES, V. C.; DIAS, H. M.; PEREIRA, M. C. A. Floristic composition of a Neotropical inselberg from Espírito Santo state, Brazil: an important area for conservation. *Check List*, v. 13, n. 1, p. 2043, 2017.
- COUTO, D.R.; KESSOUS, I. M. & COSTA, A. F. A new species of *Vriesea* (Bromeliaceae) from Pedra dos Pontões, Espírito Santo, Brazil: an area of endemism for Bromeliaceae at Atlantic Forest. **Phytotaxa**, v. 433, n. 2, p. 167–173, 2020.
- COX, B. C.; MOORE, P. D. **Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach**, 7th edition. Blackwell Publishing, London, UK, 2005.
- CRAYN, D. M.; WINTER, K.; J. SMITH, A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 3703–3708, 2004.
- D'HORTA, F. M.; CABANNE, G. S.; MEYER, D.; MIYAKI, C. Y. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. **Mol. Ecol.**, v. 20, p. 1923–1935, 2011.
- DE PAULA et al. Sugarloaf Land in south-eastern Brazil: a tropical hotspot of lowland *inselberg* plant diversity. *Biodiversity Data Journal* 8: e53135, 2020. doi: 10.3897/BDJ.8.e53135.
- DE PAULA, L. F. A.; FORZZA, R. C.; NERI, A. V.; BUENO, M. L.; POREMBSKI, S. Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: A centre of diversity for mat-forming bromeliads on inselbergs. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 459–476, 2016.
- DOMINGUES, R. et al. Genetic variability of an endangered Bromeliaceae species (*Pitcairnia albiflos*) from the Brazilian Atlantic rainforest. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 2482-2491, 2011.

- DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; PEMONGE, M.- H.; PETIT, R. J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 393-397. 1997.
- EDWARDS, S. V.; LIU, L.; PEARL, D. K. High-resolution species trees without concatenation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 5936–5941, 2007.
- ENDLER, J. A. 1977. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton. 262pp.
- ENDLER, J. A. Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. **Amer. Zool.**, 22: 441-452, 1982.
- ENNOS, R. A. et al. **Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations.** In: HOLLINGSWORTH, P.M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (Ed.). Molecular systematics and plant evolution. London: Taylor and Francis, p. 1-19, 1999.
- ESCOBEDO-SARTI J.; RAMÍREZ, I.; LEOPARDI, C.; CARNEVALI, C.; MAGALLÓN, S.; DUNO, R.; MONDRAGON, D. A phylogeny of Bromeliaceae (Poales, Monocotyledoneae) derived from an evaluation of nine supertree methods. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 51, p. 743–757, 2013.
- FERNANDES, A. M.; COHN-HAFT, M.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Rivers acting as barriers for bird dispersal in the Amazon. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 22, p. 363–373, 2014.
- FERNANDES, A. M.; WINK, M.; ALEIXO, A. Phylogeography of the chestnut-tailed antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. **Journal of Biogeography**, v. 39, p. 1524–1535, 2012.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3 ed. Brasília: CENARGEM-EMBRAPA, p. 220, 1998.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 22 Maio. 2020.
- FORZZA, R. C.; BAUMGARTZ, J. F.; COSTA, A.; HOPKINS, M. J. G.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; NADRUZ-COELHO, M.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; QUEIROZ, L. P.;

- STEHMANN, J. R.; WALTER, B. M T.; ZAPPI, D. C. As angiospermas do Brasil. In: Forzza et al. (orgs.) **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estudio/Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 78-89, 2010.
- FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R. F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R. B.; VERSIEUX, L. 2020. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6309>>.
- FOUQUET, A.; RECODER, R.; TEXEIRA, M. Jr.; CASSIMIRO, J.; AMARO, R. C.; CAMACHO, A.; DAMASCENO, R.; CARNAVAL, A. C.; MORITZ, M. C.; RODRIGUES, M. T. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 826-838, 2012.
- FRAGA et al. Fauna e flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. INMA: Santa Tereza, 2019, 432p.
- GALINDO-LEAL, C.; JACOBSEN, T. R.; LANGHAMMER, P. F. E.; OLIVIERI, S. Estado dos hotspots: a dinâmica da perda de biodiversidade. Capítulo 2. In: Galindo-Leal, C. e Câmara, I. G. (Eds). **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, p. 12-23, 2005.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B. V, RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P.A.; JABAILY, R.S., CRAYN, D. M.; SMITH, A C.; WINTER, K.; BROWN, G.K.; EVANS, T.M.; HOLST, B.K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K. J. Genetic structure of Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight- locus plastid phylogeny. **Am J Bot**, v. 133, p. 227–234, 2011.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C., BERRY, P. E., SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. In: COLUMBUS, J.T., FRIAR, E.A.; PORTER, J.M., PRINCE, L.M., SIMPSON, M.G. (eds.) *Monocots: Comparative Biology*

- and Evolution: Poales. Claremont, CA: Rancho Santa Ana Botanic Garden. **Am J Bot**, p. 3-26, 2007.
- GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. Continuamente atualizado. Encyclopaedia of bromeliads, version 4. Utrecht: University Botanic Gardens. <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Acesso 17 Agosto 2020.
- GRAHAM, C. H.; VANDERWAL, J.; PHILLIPS, S. J.; MORITZ, C.; WILLIAMS, S.E. Dynamic refugia and species persistence: tracking spatial shifts in habitat through time. **Ecography**, v. 33, p. 1062-1069, 2010.
- HAFFER, J. On the river effect in some forest birds of Southern Amazonia. **Boi. Mus. Para. Emílio Goeldi, Série Zoologia**, v. 8, p. 217-245, 1992.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, p. 131–137, 1969.
- HELED, J & DRUMMOND, A. J. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. **Research article**, v. 27, p. 570 – 580, 2010.
- HELLBERG, M. E.; BURTON, R. S.; NEIGEL, J. E & PALUMBI, S. R. Genetic assessment of connectivity among marine populations. **Bulletin of Marine Science**, 70, p. 273-290, 2002.
- HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P. F. & YODER, A.D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Awise*, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **54**, 291-301, 2010.
- HMELJEVSKI, K. V.; NAZARENO, A. G.; BUENO, M. L.; DOS REIS, M. S.; FORZZA, R. C. Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. **Ecology and Evolution**, v. 7, p. 4704–4716, 2017.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; BERMUDEZ, M. A.; MORA, A.; SEVINK, J.; SANMARTÍN, I.; SANCHEZ-MESEGUER, A.; ANDERSON, C. L.; FIGUEIREDO, J. P.; JARAMILLO, C.; RIFF, D.; NEGRI, F. R.; HOOGHMSTRA, H.; LUNDBERG, J.; STADLER, T.; SÄRKINEN, T.; ANTONELLI, A. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**, v. 330, p. 927, 2010.
- HUGGETT, R. J. **Fundamentals of biogeography**. Abingdon: Routledge, 2004. 439p.

- IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. 2nd. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 275 p. 2012.
- KATTAN, G. H.; TELLO, S. A.; GIRALDO, M.; CADENA, C. D. Neotropical bird evolution and 100 years of the enduring ideas of Frank M. Chapman. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 117, p. 407–413, 2016.
- KIMURA, M.; WEISS, G. H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v. 49, p. 561, 1964.
- KNOWLES, L. L.; MADDISON, W. P. Statistical Phylogeography. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2623-2635, 2002.
- KUBATKO, L. S.; DEGNAN, J. H. Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. **Syst. Biol**, v. 56, p. 17–24, 2007.
- KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. **Plant Omics Journal**, v. 2, p. 141-162, 2009.
- LARA, M.; GEISE, L.; SCHNEIDER, C. L. **Diversification of small mammals in the forest Atlantic of Brazil: testing alternatives**. In: Lacey E A, Myers P. (eds) *Mammalian Diversification: from Chromosomes to Phylogeography (Celebration of the Career of James L. Patton)*. University of California Press Berkeley, Los Angeles. pp. 311-335.
- LEDRU, M. P.; SALATINO, M. L. F.; CECCANTINI, G.; SALATINO, A.; PINHEIRO, F.; PINTAUD, J. C. Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. **Divers. Distrib**, v. 13, p. 761–771, 2007.
- LEITE, R.; ROGERS, D. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. **Org. Divers. Evol.**, v. 13, p. 639–664, 2013.
- LEME, E. M. C.; KOLLMANN L. J. C. New species and a new combination of Brazilian Bromeliaceae. **Phytotaxa**, v. 16, p. 1–36, 2011.
- LEME, E. M. C.; KOLLMANN, L. J. C. & FONTANA, A. P. Two new species from Pedra dos Pontões, an unexplored mountain in Espírito Santo, Brazil. **Journal of the Bromeliad Society**, v. 59, p. 152–169, 2009.
- LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual, p. 183, 1993.

- LEMEa, E. M. C.; FONTANA, A. P.; HALBRITTER, H. Three New *Pitcairnia* Species (Bromeliaceae) from the *Inselbergs* of Espírito Santo, Brazil. **Systematic Botany**, v. 3, p. 487-496, 2010.
- LEMEb et al. Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 021-067. 2010.
- LI, J. M.; JIN, Z. X. Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi* Oliv. Based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. **Genetica**, v. 133, p. 227–234, 2008.
- LOMOLINO, M. V.; RIDDLE, B. R.; WHITTAKER, R. J. et al. **Biogeography**. 4th Edition. Sinauer Associates. 375p, 2005.
- LUTHER, H. E. **An alphabetic list of Bromeliad Binomials**. The Marie Selby Botanical Gardens. 11 rd Ed. Sarasota, Bromeliad Soc International, Florida. 2008.
- MADDISON, W. P.; KNOWLES, L. L. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. **Syst. Biol**, v. 55, p. 21–30, 2006.
- MALES, J.; GRIFFTHIS, H. Functional types in the Bromeliaceae: relationships with drought-resistance traits and bioclimatics distributions. **Functional Ecology**, v. 1, p. 1868-1880, 2017.
- MANEN, J.; SAVOLAINEN, V.; AND SIMON, P. The *atpB* and *rbcL* promoters in plastid DNAs of a wide dicot range. **J. Mol. Evol**, v. 38, p. 577–582, 1994.
- MANHÃES, V. C.; MIRANDA, F. D.; CLARINDO, W. R. & CARRIJO, T. T. Genetic diversity and karyotype of *Pitcairnia azouryi*: an endangered species of Bromeliaceae endemic to Atlantic Forest *inselbergs*. **Mol Biol Rep**, v. 47, p. 179–189, 2019 <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05118-6>.
- MARTINELLI, G.; FORZZA, R. C. *Pitcairnia* L'Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L. B. Sm. **Revista Brasil. Bot**, v.29, n.4, p. 603-607, 2006.
- MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, p.209–258, 2008.
- MARTINS, F. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical

- studies tell us?. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.104, p. 499-509, 2011.
- MAYLE, F. E.; BEERLING, D. J.; GOSLING, W. D.; BUSH, M. B. Responses of Amazonian ecosystems to climatic and atmospheric carbon dioxide changes since the last glacial maximum. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 359, p. 499-514, 2004.
- MCCORMACK, J. E.; KNOWLES, L. L.; HUANG, H. Maximum-likelihood estimates of species trees: how accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. **Syst. Biol**, v. 58, p. 501–508, 2009.
- MITTERMEIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. 2011. **Global Biodiversity Conservation: the Critical Role of Hotspots**. In: Zachos, F.E. & Habel, J.C. (eds.) *Biodiversity Hotspots*. Heidelberg: Springer.
- MONTAGNINI, F.; JORDAN, C. F. **Tropical Forest Ecology**. Berlin: Springer, 2005. 295p.
- MOTA, M. R.; PINHEIRO, F.; LEAL, B. S. S.; SARDELLI, C. H.; WENDT, T.; PALMA-SILVA, C. From micro- to macroevolution: insights from a Neotropical bromeliad with high population genetic structure adapted to rock outcrops. **Heredity**, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0342-8>.
- MYERS, N.; MITTERMEYER, R. A.; MITTERMEYER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NAHUM, L. A. **Evolução dos genomas**. In Matioli, S.R.(ed.), *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora, v. 8, p. 82-96, 2001.
- PALMA – SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARA, T.; FAY, M. F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical *inselbergs*. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 3185–3201, 2011.
- PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F.; MALCOLM, J. R. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (*Rodentia: Echimydae*) of the

- Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. **Evolution**, v. 48, p. 1314-1323, 1994.
- PERES, C. A.; PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F. Riverine barriers and gene flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. **Folia Primatol.**, v. 67, p. 113-124, 1995.
- PIANKA, E. R. Latitudinal gradients in species diversity: A review of concepts. **American Naturalist**, v. 100, p. 33-46, 1966.
- PIRES, G. M. D.; CABANNE, G. S.; RODRIGUES, F. S. **How Past Vicariance Events Can Explain the Atlantic Forest Biodiversity?**. Ecosystems Biodiversity, PhD. Oscar Grillo (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/24032.
- POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, p. 579- 586, 2007.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Granitic and gneissic outcrops (*inselbergs*) as centers of diversity for desiccationtolerant vascular plants. **Plant Ecology**, v. 151, p. 19–28, 2000.
- POREMBSKI, S.; BECKER, U.; SEINE, R. Islands on islands: habitats on inselbergs. In: Porembski S, Barthlott W, eds. **Inselbergs – biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions**, vol. 146. Berlin: Ecological Studies, Springer-Verlag, p. 49–67, 2000.
- PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. **Annals Missouri Botany Garden**, v. 80, p. 902-927, 1993.
- PROVAN, J.; SORANZO, N.; WILSON, N. J.; GOLDSTEIN, D. B.; POWELL, W. A low mutation rate for Chloroplast Microsatellites. **Genetics**, v. 153, p. 943-947, 1999.
- RABOSKY, D. L.; SANTINI, F.; EASTMAN, J.; SMITH, S. A.; SIDLAUSKAS, B.; CHANG, J.; ALFARO, M. E. Rates of speciation and morphological evolution are correlated across the largest vertebrate radiation. **Nature Communications**, v. 4, p.1958, 2013.
- RAXWORTHY, C. J.; INGRAM, C. M.; RABIBISOA, N.; PEARSON, R. G. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. **Systematic Biology**, v. 56, p. 907-923, 2007.

- REX, M.; SCHULTE, K.; ZIZKA, G.; PETERS, J.; VÁSQUEZ, R.; IBISCH, P. L.; WEISING, K. Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 472 – 485, 2009.
- REZENDE, C. L.; SCARANO, F. R.; ASSAD, E. D.; JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; STRASSBURG, B. B. N.; TABARELLI, M.; FONSECA, G. A.; MITTERMEIER, R. A. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspect. Ecol. Conserv**, v. 16, p. 208–214, 2018.
- RIBAS, C. C.; ALEIXO, A.; NOGUEIRA, A. C. R.; MIYAKI, C. Y.; CRACRAFT, J. A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proc. R. Soc. B**, v. 279, p. 681-689, 2012.
- RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 225-246, 2006.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biol. Conserv**, v. 142, p. 1141–1153, 2009.
- RICKLEFS, R. E. A comprehensive framework for global patterns in biodiversity. **Ecology Letters**, 7: 1–15, 2004.
- RISSLER, L. J.; APODACA, J. J. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavopunctatus*). **Systematic Biology**, v. 56, p. 924-942, 2007.
- ROOSMALEN, M. G. M. VAN.; ROOSMALEN, R. A. VAN; MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B. A new and distinctive species of marmoset (Callithrichinae, Primates) from the lower Rio Aripuanã, state of Amazonas, Central Brazilian Amazonia. **Goeldiana Zoologia**, v. 22, p.1-23, 1998.
- SAADI, A. Neotectônica da Plataforma Brasileira: esboço e interpretação preliminares. **Geonomos**, v. 1, p. 1-15, 1993.
- SAFFORD, H. D. Brazilian páramos I: an introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. **Journal of Biogeography**, v. 26, p. 693–712, 1999.

- SAFFORD, H. D.; MARTINELLI, G. Southeast Brazil. *In Inselbergs: Biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions* (S. Porembski & W. Barthlott, eds.). Springer, Berlin, p.339-389, 2000.
- SAFFORD, H.D. Brazilian páramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. **Journal of Biogeography**, v. 34, p. 1701-1722, 2007.
- SANTOS – SILVA, F.; SARAIVA.; MONTEIRO, R.; PITA, P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. Invasion of the South American dry diagonal: what can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? **Flora**, v. 208, p. 508 – 521, 2013.
- SARAIVA, D.P.; FORZZA, R.C. *Pitcairnia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6307>>. Acesso em: 18 ago. 2020.
- SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. **Annals of Botany**, v. 90, p. 517– 524, 2002.
- SCHUBERT, K. Systematik und Evolution der Gattung Pitcairnia L'Heritier (Bromeliaceae). Universität Kassel, 2017.
- SCHULTER, K.; HORRES, R.; ZIZKA, G. Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). **Senckenbergiana Biologica**, v. 85, p. 113–125, 2005.
- SHAW, J.; LICKEY, E. B.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 275–288, 2007.
- SHINOZAKI, K.; OHME, M.; TANAKA, M.; WAKASUGI, T.; HAYASHIDA, N.; MATSUBAYASHI, T.; ZAITA, N., et al. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. **EMBO Journal**, v. 5, p. 2043–2049, 1986.
- SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In GalindoLeal C, Câmara IG (Eds). **Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectiva**, Belo Horizonte: Conservação Internacional, p. 43–59, 2005.

- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monographs**, v. 14, p. 1–662, 1974.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Fl. Neotrop Monogr.** n. 14, Part 3, Hafner Press, New York. 1979.
- SPEZIALE, K. L.; EZCURRA, C. The role of outcrops in the diversity of Patagonian vegetation: Relicts of glacial palaeofloras? **Flora**, v. 207, p. 141-149, 2012.
- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, p 132-138. 2005.
- TANKSLEY, S. D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Mol Biol Rep**, v. 1, p. 3–8, 1983.
- VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. A new species of *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, Bromeliaceae. **Hoehnea**, v. 34, p. 409-413, 2007.
- VESCO, L. L.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERERA, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 515–522, 2011.
- WALLACE, A. R. On the monkeys of the Amazon. **Proc. Zool. Soc. Lond.**, v. 20, p. 107-110, 1852.
- WEBB, S. D. Ecogeography and the Great American Interchange. **Paleobiology**, v. 17, p. 266–280, 1991.
- WERNECKa, F. P.; NOGUEIRA, C.; COLLI, G.R., SITES JR., J. W. & COSTA, G. C. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connection of South American savannas, species richness, and conservation in a biodiversity hotspot. **Journal of Biogeography**, v. 39, p. 1695- 1706, 2012.
- WERNECKb, F. P.; T. GAMBLE, G. R.; COLLI, M. T.; RODRIGUES, J.; W. SITES. Deep diversification and long-term persistence in the South American “dry diagonal”: integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. **Evolution**, v. 66, p.3014–3034, 2012.
- WOLFE, K. H.; L. I.; W. H.; SHARP, P. M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 84, p. 9054-9058, 1987.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.

ZIZKA, G.; SCHIMIDT, M.; SCHULTE, K.; NOVOA, P.; PINTO, R.; KÖNIG, K
Chilean Bromeliaceae: Diversity, distribution and evaluation of conservation status. **Biodivers Conserv**, v.18, p. 2449-2471, 2009.

Capítulo I

Sheu Y, Polo EM, Manhães VC, Carrijo TT, Miranda FD e Soares TCB (2020). ***Insights*** na diversificação de espécies neotropicais com base em uma bromélia endêmica restrita a *inselbergs*. Periódico para submissão: *Botanical Journal of Linnean Society*

Insights na diversificação de espécies neotropicais com base em uma bromélia endêmica restrita a inselbergs

Yumi Sheu^{1*}, Érico Macedo Polo², Vitor da Cunha Manhães³, Tatiana Tavares Carrijo⁴, Fábio Demolinari de Miranda⁴, Tais Cristina Bastos Soares⁵

*E-mail correspondente: yuyusheu@gmail.com

¹Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo. CEP: 29500-000 Alegre ES, Brasil.

²Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas. CEP: 69060-001 Manaus AM, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Quinta da Boa Vista. CEP: 20940-040 São Cristóvão RJ, Brasil.

⁴Laboratório de Botânica, Centro de Ciências Exatas Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. CEP: 29500-000 Alegre ES, Brasil.

⁵Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. CEP: 29500-000 Alegre ES, Brasil.

Resumo

Inselbergs são considerados afloramentos rochosos abruptamente isolados principalmente graníticos e gnássico. Abrigam tipicamente vegetação rupícola incorporada dentro de uma paisagem composta de comunidades vegetais contrastantes, das quais espécies da família Bromeliaceae se destacam como elementos característicos dessas comunidades. Neste estudo, apresentamos uma análise baseada em dados filogeográficos e populacionais integrados para investigar a diversificação de sete populações naturais de *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae) restrita aos *inselbergs* da Floresta Atlântica e como estas se relacionam a fatores históricos evolutivos. Estimou-se uma árvore coalescente utilizando cinco marcadores cloroplastidiais (cpDNA) e recuperou-se a população Pedra Lisa (Rio de Janeiro) como a mais basal no Pleistoceno do Quaternário. O cenário evolutivo sugeriu que flutuações climáticas no início do Pleistoceno poderiam atuar no estabelecimento inicial dos dois agrupamentos de *P. azouryi*. No entanto, a dispersão e colonização a novos *inselbergs* via *stepping stones* teve um papel decisivo de acordo com as nossas análises. Verificou-se que a população Pedra Lisa (RJ) e Pedra do Jacú (ES) passaram por eventos de expansão recente e efeito *bottleneck*. Nos parâmetros genéticos populacionais observou-se os maiores índices nas populações do agrupamento Rio de Janeiro. As análises de estruturação genética resultaram em índices elevados de F_{st} ($F_{st} > 0.85$) em todas as populações e, conseqüentemente limitado fluxo gênico. Os estudos com base nos locos de cpDNA demonstraram menor diversidade genética e elevada estrutura filogeográfica comparado a estudos anteriores. Dessa forma é possível concluir: (i) Pedra Lisa foi a população mais basal de acordo com as estimativas de datação molecular; (ii) Pedra Lisa e Pedra do Báu (Rio de Janeiro) foram as que apresentaram maiores estimativas parâmetros genéticos populacionais; (iii) Isolamento geográfico e deriva genética foi um fator preponderante; (iv) Todas as populações conferiram alta estrutura filogeográfica, contendo haplótipos singulares e com baixa diferenciação. No que tange a conservação, recomenda-se medidas de proteção aos *inselbergs* para todas as populações de *P. azouryi*

Palavras-chave: cpDNA, deriva genética, filogeografia, Pitcairnioideae, região Neotropical

Introdução

Inselbergs podem ser definidos como afloramentos rochosos graníticos ou gnáissico abruptamente isolados (Porembski & Barthlott, 2000). Por causa de sua natureza geográfica insular, estes afloramentos são frequentemente comparados a ilhas oceânicas, já que a maioria deles exibe um marcante grau de isolamento ecológico da área circundante (Porembski *et al.*, 2000; Burke, 2003). Por estas características, os *inselbergs* oferecem um ambiente único para investigação de processos de especiação, diversificação e isolamento reprodutivo em plantas residentes em *inselbergs* (Hmeljevski *et al.*, 2017; de Paula *et al.*, 2017; Mota *et al.*, 2020). Entre as famílias com grande representatividade nos *inselbergs* esta Bromeliaceae (de Paula *et al.*, 2016, 2020; Couto *et al.*, 2017) das quais os gêneros *Alcantarea*, *Orthophytum*, *Pitcairnia*, *Stigmatodon* e *Tillandsia* dominam a paisagem de *inselbergs* no Brasil (de Paula *et al.*, 2016; 2020).

Evidências paleobotânicas sugerem que afloramentos rochosos cobriram os cumes das montanhas do sudeste do Brasil desde o Pleistoceno (Behling 1997; Safford 1999). Alguns autores defendem que *inselbergs* podem ter atuado como refúgio para espécies xerófilas ou adaptadas ao frio durante ciclos glaciais no Pleistoceno (Scarano, 2002; Speziale & Ezcurra, 2012; Tapper *et al.*, 2014), quando o clima mais seco favoreceu a expansão das espécies adaptadas a tal condição no Brasil (Behling 2002; Ledru *et al.*, 2007; Carnaval & Moritz 2008).

Estudos prévios que se propuseram a investigar a história evolutiva de espécies de bromélias especialistas de *inselbergs*, tais como *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harmse e *A. geniculata* (Wawra) J.R.Grant (Barbará *et al.*, 2007, 2009), *Encholirium horridum* L.B. Sm (Hmeljevski *et al.*, 2017) e quatro

espécies do gênero *Pitcairnia* L'Hér (*P. albiflos* Herb., *P. staminea* G.Lodd., *P. corcovadensis* Wawra e *P. flammea* Lindl.) com ocorrência na Floresta Atlântica (Palma-Silva *et al.*, 2011), *P. flammeae* Lindl (Mota *et al.*, 2020) demonstraram um padrão constatado em populações localizadas em afloramentos rochosos: reduzido fluxo gênico intraespecífico entre *inselbergs* e níveis extensos de diferenciação genética entre populações e isolamento prolongado.

Pitcairnia azouryi Martinelli & Forzza é uma espécie de Bromeliaceae endêmica da região Sudeste do Brasil. Suas populações ocorrem exclusivamente em *inselbergs* localizados nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Manhães *et al.*, 2016). Por esta razão, *P. azouryi* constitui um modelo biológico excelente para se investigar forças que dirigem os processos evolutivos e de estruturação populacional em espécies restritas a *inselbergs* da Floresta Atlântica.

Um estudo prévio realizado por Manhães *et al.* (2020), investigou a diversidade a genética das populações de *P. zouryi* em sua totalidade. Este estudo revelou que a população ocorrente em um dos extremos (Pedra Lisa do Rio de Janeiro) da distribuição geográfica da espécie foi a mais divergente, apresentando maior grau de estruturação. Os autores não abordaram aspectos evolutivos em uma escala histórica temporal, de forma que os processos que levaram aos padrões de diversidade genética encontrados permaneceram desconhecidos. Entender os processos que possibilitaram a diversificação das populações de *P. azouryi* requer a compreensão dos padrões filogeográficos e das forças que dirigiram os processos evolutivos de diversificação de suas populações.

A fim de suprir esta lacuna de conhecimento, foram utilizados neste trabalho cinco marcadores cloroplastidiais (cpDNA) para a reconstrução de uma árvore coalescente com tempos de divergência específicos para cada população. Esperamos responder alguns questionamentos: 1) Quais os mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação de *P. azouryi* com base nos padrões filogeográficos das populações encontrados?, 2) Os padrões estão em consonância com os trabalhos anteriores com plantas residentes de *inselbergs*? e por fim, c) Qual a relação das flutuações climáticas do Quaternário na diversificação das populações de *P. azouryi*?

Material e Métodos

Framework do estudo

Um conjunto de dados genéticos foi usado para investigar a influência de fatores históricos na distribuição e diversificação de *P. azouryi*. Primeiramente, foram averiguadas as relações filogenéticas dos indivíduos de diferentes populações em nível de árvore gênica e, posteriormente, na forma de uma árvore coalescente com comprimento dos ramos e tempos de divergências respectivos, incluindo o uso de dados multi-locus sob modelo de coalescência. Em seguida, a rede de haplótipos foi inferida, seguida das análises filogeográficas e populacionais subsequentes.

Amostragem

Esse estudo representa um aumento substancial no esforço amostral para a espécie *P. azouryi*, incluindo uma amostragem geográfica, de indivíduos e

marcadores, mais ampla do que qualquer trabalho já feito com a espécie. O conhecimento prévio da literatura (Martinelli & Forzza 2006; Leme *et al.*, 2010; Manhães *et al.*, 2016, 2019) juntamente com o esforço de coleta em todas as populações mapeadas por Manhães *et al.* (2016), incluindo duas novas populações registradas durante o desenvolvimento deste estudo, forneceram subsídios para abrangência máxima da amostragem e adequação a este estudo.

As amostras foram coletadas a partir de tecidos foliares armazenados em sílica gel, provenientes de 90 indivíduos de sete populações de *P. azouryi*. Alguns *inselbergs* estão agrupados em “complexos rochosos” e outros, isolados em monólitos (Tabela 1).

Para as coletas individuais, foram estabelecidos no mínimo cinco metros de distâncias entre cada amostra coletada (Figura 1). Os vouchers dos materiais coletados foram depositados, um de cada população, no herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (acrônimo segue Thiers – constantemente atualizado). Todos os procedimentos de coleta de dados genéticos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFES.

Ensaio laboratorial e preparação de dados

O DNA genômico total foi isolado e purificado usando o método de extração de Doyle & Doyle (1990) modificado. Para cada amostra foram utilizados 700 µL de tampão de extração com a seguinte constituição: 2% v/v de CTAB, 1,4 mol/L de NaCl₂, 20 mmol/L de EDTA, 100 mmol/L de Tris-HCl a pH 8,0; 2% p/v de Polivinilpirrolidona sólida e 0,2% v/v de β-mercaptoetanol. A partir

da extração, foi realizada a quantificação de DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8% e via quantificação por espectrofotômetro NanoDrop® 2000.

Selecionou-se previamente cinco marcadores cpDNA envolvendo estudos evolutivos com a subfamília Pitcarnioideae, tais como: o rpS16 – trnK (Shaw *et al.*, 2007), rpl32 – trnL (Shaw *et al.*, 2007), psaB - psbH (Shinozaki *et al.*, 1986), atpB - rbcL (Manen *et al.*, 1994) e matK (Schutle *et al.*, 2005). Vale ressaltar que a maioria das subfamílias e gêneros, em especial Pitcarnioideae, confere uma baixa diferenciação molecular (Escobedo-Sarti *et al.*, 2013). Desta forma, a adição de mais genes cloroplastidiais será determinante no estabelecimento das relações filogenéticas das populações de *P. azouryi*.

Todos os marcadores cloroplastidiais (cpDNA) foram testados e amplificados para um subconjunto dos indivíduos de todas as sete populações com as condições especificadas com os autores da Tabela 2. As reações para a amplificação foram obtidas em um volume final da reação de 15µL contendo 2 mM de MgCl₂, 10mM/50mM de Tris/KCl pH 8,3, 0,1mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,4 µM de primer (F e R), 1 unidade de Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA) e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em um termociclador de marca Applied Biosystems, modelo Veriti® Thermal Cycler.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,02 uLmL⁻¹ de brometo de etídio em tampão TBE 1x (Tris – 0,89 M, Ácido bórico – 0,89 M e EDTA – 0,02 M). Após a corrida os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, e a análise dos géis foram realizadas de acordo com o número e tamanho de fragmentos amplificados.

A purificação do produto de PCR amplificado foi realizada com a adição de Polietilenoglicol (PEG, 1 g/mL) misturado, incubado a 37°C por 15 minutos,

centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos, com descarte do sobrenadante e lavagem em etanol gelado a 80%. Posteriormente, os produtos de PCR foram enviados para a empresa Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte), na qual foram sequenciados por eletroforese capilar Thermo Scientific (ABI3730) usando POP7 polímero e BigDye3.1.

Todas as sequências obtidas foram editadas no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) e alinhadas no Muscle (Edgar, 2004). Além disso, as mesmas foram verificadas e alinhadas no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) a fim de verificar as homologias e identidades no banco de dados mundial.

Foi realizada uma busca pelo modelo evolutivo mais apropriado para explicar a variação das sequências gênicas através do programa JModeltest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012), sob o Critério de Informação Bayesiana (BIC). A saturação das bases foi verificada através do programa Dambe v. 4.2.13 (Xia & Xie, 2001), onde foram plotados os números de transições e transversões versus a divergência nucleotídica sob o modelo Tamura-Nei (1984).

Análises filogenéticas e datação

As análises filogeográficas foram realizadas utilizando um banco de dados concatenados no programa Geneious 7.0 (Kearse *et al.*, 2012), contendo 93 acessos (90 acessos internos e 3 acessos externos representados por *Dyckia dawsonii* L.B. Sm., *Dyckia ferox* Mez e *Fosterella petiolata* (Mez) L.B. Sm.), incluindo cinco marcadores cloroplastidiais. As amostras não sequenciadas para determinados genes foram preenchidas como *missing data* pelo programa.

Foram realizadas análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). Todas as amostras foram depositadas no Genbank (acessos e

ID do genbank xxx-xxx). Os acessos xxx foram utilizados como *outgroup* para todas as análises filogenéticas.

A IB foi estimada dentro da cadeia de Monte Carlo (MCMC) com 20.000.000 de gerações, sendo amostradas uma árvore a cada 1000 gerações, implementadas no programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e foram utilizados os mesmos modelos de substituições de nucleotídeos selecionados para cada gene anteriormente. O programa TRACER versão 1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2007) foi usado para avaliar a convergência das cadeias e estacionaridade de todos os parâmetros amostrados pelas análises, 10% das árvores geradas antes das cadeias de Monte Carlo convergirem foram descartadas como *burn-in*. Depois de descartada a fase inicial não estacionária, a árvore consenso é gerada ao final da análise, sendo considerados bem suportados os ramos cujos valores de *probability posteriori (pp)* acima de 90% (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

A análise de MV foi obtida com o auxílio do programa RAxML-HPC2 *on XSEDE*, disponível no site Portal Cipres (<https://www.phylo.org/>) (Miller & Schwartz, 2010) e RAxML V8 (Stamatakis, 2014). A melhor árvore de MV foi obtida a partir de uma busca heurística dentre 100 árvores e o suporte dos ramos com 1000 réplicas de *bootstrap (bs)*. Para a árvore de MV, foram considerados bem suportados os ramos cujos valores de *bs* foram iguais ou superaram 70%, seguindo a sugestão de Hillis & Bull (1993).

As linhagens a partir das árvores gênicas dos múltiplos locos foram estimadas sob um modelo coalescente e datação molecular. Os tempos de divergências foram estimados simultaneamente, usando o programa BEAST versão 2.6 (Bouckaert *et al.*, 2019). Os modelos evolutivos e partições para o

BEAST foram determinados com o PartitionFinder2 (Lanfear *et al.*, 2016). Devido à ausência de fósseis devidamente posicionados em Bromeliaceae, com exceção de *Karatophyllum bromelioides* L.D.Gómez (datado do Pleistoceno Superior) (Baresch *et al.*, 2011), utilizamos calibrações secundárias baseadas em Givnish *et al.*, (2011). A divergência entre *Dyckia* e *Fosterella* foi estimada para 11,3 Ma, sendo esta data utilizada como critério de informação para calibração do ancestral comum mais recente (MRCA *most recent common ancestor*) deste nó, considerando uma distribuição normal e um desvio padrão de 0,5 (*Stdev*).

Usou-se o relógio molecular relaxado não correlacionado (*Lognormal relaxed clock - uncorrelated*) para permitir uma heterogeneidade na taxa entre linhagens e o modelo de especiação de Yule (*Yule Process pure-birth*). A estacionariedade de todos os parâmetros foi verificada utilizando o Tracer 1.7 (Rambaut & Drummond, 2018). Posteriormente, as corridas e árvores foram combinadas utilizando o programa LogCombiner (Drummond & Rambaut, 2007), descartando-se 10% das primeiras árvores como *burn-in*. Por fim, a árvore de credibilidade máxima de clados (*maximum clade credibility tree – MCC*) foi computada usando TreeAnnotator v2.6 (Drummond & Rambaut, 2007) e o programa Figtree v1.4.4. (Rambaut, 2008) para traçar e visualizar todas as árvores na reconstrução ancestral.

Análises filogeográficas e populacionais

As populações foram definidas com base nos ramos bem apoiados resultantes das árvores de MV e IB e nos resultados obtidos por análises de agrupamento bayesiano inferidas com o BAPS v6.0 (Corander *et al.*, 2008).

O BAPS (Corander & Tang, 2007; Corander *et al.*, 2008) estima a subestrutura genética agrupando populações amostradas em grupos. Nós assumimos que todos os *linked loci* (cpDNA) estão ligados, e inicialmente, foi definida uma corrida com o número máximo dos clusters populacionais (K) por *genetic mixture* com base na otimização estocástica, para inferir a probabilidade posterior (*pp*) do número de populações. Uma vez calculado o valor de K, realizamos 10 corridas markovianas independentes para cada um dos valores dos clusters populacionais (K), que variaram de 4 a 6. A partir do esforço amostral, todas as corridas foram convergidas, sumarizando a *pp* do melhor K encontrado.

O software Haploviewer v4.1 auxiliou na construção de redes de haplótipos (Barrett *et al.*, 2005), determinando o número de haplótipos únicos e a distribuição dos haplótipos compartilhados com base em cálculos de verossimilhança, a partir de da árvore gerada no RAxML V8 (Stamatakis, 2014).

Para as inferências populacionais, primeiramente foi calculada a matriz de distância genética (sob o modelo Tamura-Nei corrigido) entre os grupos definidos pelas inferências filogenéticas com o auxílio do programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Posteriormente, na avaliação do nível de influência da distância geográfica pela distância genética foram feitas comparações par-a-par entre os indivíduos das populações, através do teste de Mantel, com o auxílio do programa Alleles in Space (Miller, 2005) com 1000 randomizações.

A análise de variância molecular (AMOVA) para os genes cloroplastidiais concatenados foi calculada entre e dentro de todos os grupos obtidos a partir das análises filogeográficas. Foram feitas diferentes comparações em dois níveis hierárquicos (grupo por grupo) obtendo uma matriz de ϕ_{st} para avaliar a estrutura

das populações genéticas. Todas as análises supracitadas foram feitas com o auxílio do programa Arlequim 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Diversas métricas populacionais, tais como: número de sítios polimórficos, número de haplótipos, diversidades haplotípica e nucleotídica, índice de fixação (F_{st}) de cada grupo foram estimadas com auxílio dos do programa Arlequim 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) e DnaSP v.5 (Rozas & Rozas, 1999).

Além disso, testou-se a ocorrência de expansão populacional na demografia de *P. azouryi*, para cada população estabelecida pela árvore filogenética, pelos índices de fixação (ϕ_{st}) de cada grupo; e os valores dos testes D de Tajima (Tajima, 1996) e F_s de Fu (Fu, 1996) com 1000 permutações. O F_s leva em consideração o número de haplótipos diferentes dentro da amostra e tende a ser negativo quando há excesso de mutações recentes (Fu, 1997). O teste D apresenta valor negativo quando há excesso de polimorfismos de baixa frequência indicando expansão do tamanho populacional e/ou seleção positiva, e valor positivo quando há baixos níveis de polimorfismos de alta e baixa frequência indicando diminuição do tamanho populacional e/ou seleção balanceada (Tajima, 1989). Ambos os testes são considerados sensíveis em detectar a fatores como efeito gargalo ou expansão populacional. Assim, espera-se que apresentem valores negativos se a estrutura genética for influenciada por tais fatores (Tajima, 1996; Nei, Kumar, 2000).

Resultados

Composição e saturação do banco de dados

Um total de 3537 pares de bases (pb) foi sequenciado para 90 indivíduos de *P. azouryi*. Os cinco marcadores apresentaram os seguintes números de pb separadamente: atpB-rbcL (727), matk (753), psaB-psbH (608), rpl32-trnL (671) e rpS16-trnK (703), respectivamente. Os modelos evolutivos mais adequados sob o critério BIC foram: HKY + I para atpB-rbcL, HKY + I para matk e F81 para psaB-psbH, rpl32-trnL e rpS16-trnK. Quanto à variabilidade dos marcadores, o gene atpB-rbcL no geral apresentou maior quantidade de sítios variáveis e informativos. Ademais, o marcador rpS16-trnK, conferiu a maior diversidade haplotípica. Um panorama geral da variabilidade dos marcadores é exibido na Tabela 3.

A análise gráfica das transições e transversões *versus* a divergência nucleotídica foi calculada para o banco de dados concatenados. Observou-se que a taxa de transição/transversão está aumentando linearmente com o tempo, indicando que os dados não se mostraram saturados e com sinal filogenético, podendo ser utilizado para inferências filogenéticas apresentadas na Figura 2.

Relações filogenéticas e datação

As relações filogenéticas estimadas IB e VM com base nos conjuntos de dados separados por gene e concatenado (Figura S1 e Figura 3). Entre todas as árvores geradas, a concatenada foi a que revelou maior estruturação para os grupos das linhagens/populações de *P. azouryi*. As árvores filogenéticas resultantes das análises de IB e de MV apresentaram os mesmos agrupamentos filogenéticos (Figura 3), haja vista o posicionamento diferente em alguns clados. No geral, em ambas as inferências, a confiabilidade dos dados foi fortemente suportada por *pp* e *bs* altos (>0,90), recuperando todas linhagens de *P. azouryi*.

A topologia concatenada confirmou a dicotomia inicial das linhagens de *P. azouryi* das sete populações em dois grandes agrupamentos: agrupamento do Espírito Santo composto por (Pedra Lisa + Pedra Três Irmãs + Pedra Parada Cristal + Pedra das Andorinhas e Pedra do Jacú) com $pp/bs = 1.0/100$ e agrupamento do Rio de Janeiro composto por (Pedra Lisa + Pedra do Baú) e $pp/bs = 1.0/100$. Somente a topologia MV recuperou Pedra do Jacú ($bs=95$) como a população-irmã das demais do agrupamento Espírito Santo. Apesar da topologia IB ter sido estabelecida com altos suportes para as populações, a relação entre os grupos do agrupamento Espírito Santo permanece ainda controversa. Em ambos os casos (MV e IB), não foi observada introgressão de indivíduos de uma população para outra. Em contraste, foi observado que as árvores gênicas individuais geradas, apresentaram pouca estruturação intraespecífica e sinal filogenético e, portanto, as relações entre os indivíduos da mesma população ficaram pouco resolvidas, gerando incertezas a respeito das relações filogenéticas entre as linhagens (ver em Figura S1). Desta forma, em todas as análises *a posteriori* optou-se por utilizar os dados concatenados dos marcadores cpDNA. A árvore de linhagens multi-loci recuperou, com suportes altos, a dicotomia dos dois agrupamentos (Espírito Santo e Rio de Janeiro) (Figura 4). A topologia evidenciou uma primeira divergência ($pp=1$) do agrupamento Espírito Santo (populações do sul do Espírito Santo) e o agrupamento Rio de Janeiro (populações do norte do Rio de Janeiro) ocorrendo há cerca de 2,46 milhões de anos atrás (Ma).

Os eventos de diversificação seguintes foram responsáveis pela primeira divergência que ocorreu entre as populações de Pedra Lisa e Pedra do Baú do agrupamento Rio de Janeiro ($pp=0,99$) há aproximadamente 1,56 Ma.

Posteriormente, seguiu-se com a divergência das populações do agrupamento Espírito Santo, sendo: a população Pedra do Jacu estimada para aproximadamente 0,8 Ma ($pp=1$). Além disso, as populações Pedra Lisa + Pedra Três Irmãs e Pedra Andorinhas + Pedra Parada Cristal foram datadas mais recentemente a 0,37 Ma ($pp=0,98$), sendo essa última (Pedra Andorinhas + Pedra Parada Cristal) ainda não bem estabelecida ($pp=0,49$). Todos os eventos calibrados das nossas análises ocorreram recentemente no Pleistoceno, durante o Quaternário.

Inferências filogeográficas e populacionais

A análise de estruturação populacional estimou mais de um valor K encontrado inicialmente para o agrupamento Espírito Santo, pois quatro populações do Espírito Santo estavam plotadas em uma única partição.

Nesses casos, foi realizada uma análise hierárquica, dentro do agrupamento Espírito Santo e expansão do número K para que a amostragem populacional total fosse contemplada de acordo com Willems *et al.*, (2012). A maior probabilidade encontrada foi K = 7. Cada população estimada pelo BAPS está representada por uma coloração distinta no *Barplot*. As cores atribuídas aos agrupamentos resultantes da árvore filogenética são equivalentes à coloração dos pontos plotados no mapa (Figura 5 A-C).

As regiões geográficas e suas respectivas localidades referentes a cada grupo filogenético estão representadas na Tabela 4. Não foi observada mistura dos agrupamentos genéticos dos indivíduos. As delimitações geográficas das populações estão em concordância com as inferências filogenéticas (Figura 4), nas quais o grupo F e G (grupo Rio de Janeiro) seriam os primeiros a divergirem

dentro de *P. azouryi*. A maioria dos nós basais do agrupamento Espírito Santo são suportados pelos valores de *pp* e *bs* das árvores concatenadas (Figura 3) e *pp* da árvore coalescente (Figura 4), à exceção de Pedra Andorinhas + Pedra Parada Cristal ($pp < 90\%$). Além disso, dentro do mesmo agrupamento, Pedra do Jacú foi a população irmã de todas as demais populações (Laranja) (Figura 5A).

A rede de haplótipos do conjunto de dados concatenados revelou 25 haplótipos únicos agrupados em sete haplogrupos concordantes com os agrupamentos formados pelas inferências filogenéticas MV, IB e multi-loci (Figura 5C), onde os haplogrupos do agrupamento Rio de Janeiro aparecem bem definidos, com separação das populações do agrupamento Espírito Santo por 37 passos mutacionais, não apresentando haplótipos compartilhados entre eles.

Apesar da divisão dos haplogrupos Pedra Andorinhas e Pedra Parada Cristal, elas apresentaram separadas por apenas um passo mutacional. As árvores filogenéticas e a datação molecular revelam que as relações entre as duas populações são pouco resolvidas, mesmo que haja certo nível de estruturação entre elas. Ademais, o haplogrupo composto por Pedra do Jacú conferiu quatro passos mutacionais sendo o maior número de haplótipos únicos dos demais do agrupamento Espírito Santo.

Na rede de haplótipos dos genes individuais (Figura S2) foi observado o compartilhamento de haplótipos entre alguns grupos, não apresentando estruturação geográfica evidente, com ressalvas a formação definida para todos os genes entre as populações (do agrupamento Rio de Janeiro).

A exceção, o marcador rpS16 –trnK (com a maior diversidade haplotípica – Tabela 1) conferiu uma estruturação básica muito similar a rede de haplótipos concatenada. De acordo com o número de haplótipos, os genes individuais

exibiram pela rede de haplótipos, respectivamente: atpB-rbcL (8 haplótipos), matk (9 haplótipos), psaB-psbH (5 haplótipos), rpl32-trnL (8 haplótipos) e rpS16-trnK (9 haplótipo) (ver Figura S2 A-E). O teste de Mantel, calculado baseado no conjunto de dados dos marcadores cloroplastidiais concatenados, detectou correlação significativa ($p < 0,05$) entre as distâncias geográficas e genéticas das populações ($r = 0,977$) (Figura 6).

A matriz de distância genética revelou maior variabilidade entre os clados do que dentro deles. A matriz de distância-p corrigida pelo modelo de Tamura-Nei conferiu as maiores diferenças genéticas foram encontradas entre o grupo F e G e as demais populações, principalmente comparado com os grupos B e C (Tabela 5). Os valores apresentados na matriz de distância corrigida pelo modelo de Tamura-Nei variaram de 0,00028, quando foram comparados os grupos B com C e D, até 0,00762, obtido ao comparar o grupo G com o grupo A.

Para os marcadores cloroplastidiais concatenados, a AMOVA conferiu uma maior diferenciação entre os grupos filogenéticos do que entre os indivíduos dentro dos grupos, de acordo com o valor do índice de fixação (ϕ_{st}), nas populações definidas pelas análises filogeográficas (97,75%) (Tabela 6).

A matriz de ϕ_{st} resultantes da comparação par-a-par entre as sete populações (sete grupos filogenéticos no BAPS) apresentou todos os valores significativos ($p \leq 0,05$) de grande diferenciação genética. Não foi observada nenhuma comparação não significativa. Os maiores índices foram alcançados quando se comparou as populações (agrupamento Rio de Janeiro) com as demais populações do agrupamento Espírito Santo, principalmente para a população Pedra Lisa (grupo F). Os menores valores de ϕ_{st} obteve-se ao comparar o grupo D (Pedra Parada Cristal) com o grupo A (Pedra Lisa

agrupamento Espírito Santo) e C (Pedra Andorinhas), respectivamente (Tabela 7).

Todos os cálculos dos parâmetros populacionais genéticos restringiram-se apenas aos marcadores cloroplastidiais concatenados, uma vez que, individualmente, os mesmos conferem baixa variabilidade entre as populações. As métricas populacionais foram calculadas de acordo com os agrupamentos das populações resultantes da árvore filogenética (MV e IB) e do BAPS na (Tabela 8). Os maiores índices de diversidade haplotípica foi observado para o agrupamento Rio de Janeiro (Pedra Lisa +Pedra do Baú), seguido do grupo filogenético E (Pedra Jacu) com 0,385 e B (Pedra Três Irmãs) com 0,299, sendo essas últimas do agrupamento Espírito Santo. Além disso, a maior diversidade nucleotídica foi exibida pelo grupo G (Pedra do Baú). Novamente, o grupo F obteve o maior valor de diferenciação genética, seguido do grupo G também do agrupamento Rio de Janeiro, e do grupo E (Pedra do Jacú, agrupamento Espírito Santo).

No geral, todas as métricas de diversidade genética como as estimativas de número de haplótipos, sítios polimórficos, número de sítios segregantes, diversidade nucleotídica e haplotípicas foram maiores para as populações do agrupamento Rio de Janeiro (Pedra Lisa e Pedra do Baú).

Os cálculos de desvio de neutralidade foram significativos apenas para o grupo F (Pedra Lisa do agrupamento Rio de Janeiro) para ambos os testes (D de Tajima e F_s de Fu) e para a população Pedra do Jacú do agrupamento Espírito Santo (somente F_s de Fu). Todos os valores significativos resultantes dos testes de desvio de neutralidade foram negativos, indicando expansão populacional para esse grupo.

Discussão

Dinâmica histórica e populacional de *P. azouryi*

As reconstruções filogenéticas utilizando métodos probabilísticos (MV e IB) e árvore coalescente realizadas aqui detectaram a presença das sete populações de *P. azouryi*, com confiabilidade dos dados, no geral, alta. A adição de mais genes cloroplastidiais foi determinante no estabelecimento das relações filogenéticas das populações de *P. azouryi*, se mostrando uma ferramenta viável para estudos de filogeografia e sendo de grande valia à investigação e compreensão dos processos ecológicos e evolutivos mais recentes atuantes nas populações (Frankham *et al.*, 2008; Antonelli & Sanmartín, 2011).

O monofiletismo dos agrupamentos foi confirmado com a amostragem intraespecífica mais densa que empregamos em relação ao estudo de Manhães *et al.*, (2019), no entanto, algumas das relações das populações do agrupamento Espírito Santo ainda não foram bem resolvidas. Por exemplo, populações de Pedra Parada Cristal e Pedra Andorinhas conferiram baixo suporte de alguns ramos sendo refletida na árvore multiloci sob modelo de coalescência (Figura 4). Certamente, com a adição de marcadores nucleares e/ou microssatélites (SSR), poderão elucidar e resolver certos clados e ramos ainda controversos e não resolvidos.

De acordo com os resultados do relógio molecular relaxado e calibração fóssil, as datações da árvore coalescente foram concordantes com diversos estudos filogenéticos (Givnish *et al.*, 2011; Schubert, 2017; Schütz *et al.*, 2016). O grupo-basal da subfamília Pitcarnioideae (que inclui os gêneros *Pitcairnia*, *Fosterella*, *Deuterocohnia*, *Dyckia* e *Encholirium*) surgiu no Mioceno Tardio (13,4 Ma) nos Andes, concordantes com as nossas estimativas (Figura 4), sendo tais

resultados decorrentes provavelmente da calibração adotada por Givnish *et al.*, (2011).

Nossos resultados indicam também a existência de uma dicotomia evolutiva para as populações de *P. azouryi* do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, que aparentemente divergiram a 2,46 Ma, durante o Pleistoceno inicial ($pp > 0.90$), indicando um papel atuante das primeiras glaciações na divergência desses dois agrupamentos. Silva *et al.* (2018) indicou grandes transições na dinâmica climática durante a transição Plioceno-Pleistoceno ao longo de 2,5 Ma, apontando as primeiras glaciações no Quaternário como um fator decisivo à diversificação das espécies. Mota *et al.* (2020) apontou um papel plausível das primeiras glaciações do Pleistoceno na divergência nas linhagens da bromélia *P. flammea*. Ademais, algumas investigações apontam que a atuação das flutuações climáticas no Último Máximo Glacial no Pleistoceno Tardio foi decisiva na diversificação das espécies da América do Sul (Carnaval *et al.*, 2014; Turchetto-Zolet *et al.*, 2016).

Muito embora as flutuações climáticas no Pleistoceno foram mais pronunciadas em regiões temperadas. Nas zonas tropicais, os períodos glaciais foram caracterizados por redução de chuvas e queda de temperatura (em até 58°C) em comparação ao presente (Dynesius & Jansson, 2000). Isto pode ter tido uma significativa contribuição na diversificação de espécies (Pennington *et al.*, 2000, Bonaccorso *et al.*, 2006, Hoorn *et al.*, 2010), resultando na fragmentação das populações em áreas menores, em determinados períodos.

Nesse cenário evolutivo, a população Pedra Lisa (agrupamento Rio de Janeiro) desponta como a mais antiga na reconstrução filogenética datada de 0,28 Ma, sendo a única a conferir uma expansão populacional recente

significativa ($D = -1,8311$ e $FS = -2,44337$) pelos testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1996) e F_s de Fu (Fu, 1996). Outrossim, confere os maiores resultados na maioria dos parâmetros genéticos populacionais aqui investigados ($H_d = 0,538$; $\pi = 0,00030$; $h=5$; $k=5$) juntamente com a população Pedra do Baú do Rio de Janeiro (Tabela 8). Manhães *et al.* (2019) avaliando a diversidade cariotípica e genética através de microssatélites (SSR) em populações de *P. azouryi*, concluiu que Pedra Lisa do Rio de Janeiro foi a população mais divergente. A divergência maior desta população foi justificada pelos autores com base no maior isolamento geográfico desta população comparado às demais. Nossos resultados (históricos e populacionais) estão em consonância com Manhães *et al.* (2019), porém evidenciam os processos evolutivos que explicam a maior divergência da população de *P. azouryi* do Rio de Janeiro.

Os teste de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1996) e F_s de Fu (Fu, 1996) sugerem também a atuação do efeito gargalo na população Pedra Lisa (Rio de Janeiro), de forma que o estabelecimento inicial (0,30 Ma) e posterior colonização na população Pedra do Baú (0,28 Ma) pode ter tido uma influência significativa da deriva genética, somado as oscilações climáticas que estavam ocorrendo no Pleistoceno tardio.

Concomitantemente a esses eventos, ocorreu o surgimento da população de Pedra do Jacú há 0,17 Ma ao norte do Espírito Santo. De acordo com os parâmetros genéticos populacionais investigados, exibindo os maiores resultados ($H_d = 0,385$; $\pi = 0,00020$; $h=5$; $k=4$), seguido da população Pedra Três Irmãs (0,11 Ma) (Tabela 8). Apesar da pouca informação genética das outras populações do mesmo agrupamento, visto a natureza conservada do marcador cpDNA (Adhikari *et al.*, 2017), pode-se verificar com os testes de F_s

de Fu (Fu, 1996) de que Pedra do Jacú tenha sofrido um efeito gargalo mediante a efeitos das flutuações climáticas no Pleistoceno tardio, com posterior atuação da deriva genética nas dispersões e expansões de *inselbergs* recentes. O efeito gargalo pode ter reduzido de forma significativa a diversidade genética, predispondo ao aumento da endogamia (Honnay & Jacquemyn, 2007; Templeton, 1980; Hedrick, 2005).

Em suma, ocorreu uma grande separação em dois agrupamentos populacionais (Espírito Santo e Rio de Janeiro) no início da história evolutiva de *P. azouryi*, sugerindo que as flutuações climáticas pretéritas do Quaternário foram importantes na divergência entre as populações. No entanto, a atuação via *stepping stones* para o estabelecimento e colonização das populações de Pedra Lisa, a mais antiga do Rio de Janeiro (0,28 Ma) e de Pedra do Jacú, Espírito Santo (0,17 Ma), teve um papel mais decisivo de acordo com as nossas análises, mesmo no Pleistoceno. Estes eventos resultaram em uma estratégia na qual as populações terminariam por ocupar novos ambientes/*inselbergs* (expansão recente) através de poucos indivíduos fundadores (efeito fundador) nas demais populações, influenciado diretamente por deriva genética a diferenciação genética populacional.

O modelo *stepping stone* (ou isolamento por distância), considera que o grau de isolamento pode interferir de maneira significativa na diferenciação genética, uma vez que populações conferem uma redução gradual na similaridade genética devido ao aumento da distância geográfica e restrição da dispersão (Kimura & Weiss, 1964; Hellberg *et al.*, 2002). Desta forma, as estimativas de fluxo gênico para populações sofrendo processos de *stepping stone* serão mais altas em populações mais próximas e reduzidas nas mais

distantes (Hellberg *et al.*, 2002). Neste modelo, onde o isolamento geográfico influencia consideravelmente o fluxo gênico (Wright, 1978; Frankham *et al.*, 2008), nossos resultados indicam haver alta diferenciação genética entre populações pelo cálculo da AMOVA e entre as populações pelo BAPS, com K=7 (Figura 5, Tabela 6 e 7).

Os valores elevados de ϕ_{st} encontrados, das populações Pedra Lisa (grupo F) e Pedra do Baú (grupo G) do agrupamento Rio de Janeiro para com as demais populações do Espírito Santo ($>0,98$), indicaram um baixíssimo fluxo gênico entre elas. Além disso, o padrão espacial geográfico do haplogrupos F e G (37 passos mutacionais e distando >60 km) da Figura 5, reiteram que essas populações possam ter sofrido processos de isolamento, sendo atribuída à deriva genética como a força evolutiva que promove a alta diferenciação genética vistos pelos altos valores de ϕ_{st} (Tabela 7). Boisselier-Dubayle *et al.* (2010), encontrou um padrão consonante com as nossas investigações, uma elevada diferenciação genética para *P. geyskesii* LB.Sm e sugerindo o isolamento por distância entre arquipélagos de *inselbergs* como o mecanismo mais provável.

A correlação significativa do Teste de Mantel (Figura 6) entre a distância genética e geográfica (km) reitera as observações sobre o baixo fluxo gênico entre populações em *inselbergs* distantemente relacionados. Manhães *et al.*, (2019) recuperaram também uma correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas, considerando a população Pedra Lisa (agrupamento Rio de Janeiro) mais divergente de acordo com estimativas de estruturação populacional.

Ainda que as populações do agrupamento do Espírito Santo estejam separadas por alguns quilômetros e exibam diferenciação alta, pode-se verificar

que foram os menores valores de ϕ_{st} encontrados, sugerindo um maior fluxo gênico intercambiáveis entre elas (populações C e A, distam a 9,5 km de distância, com $\phi_{st} = 0,852$ e populações D e C, distam a 1,3 km de distância, com $\phi_{st} = 0,850$). Esta última comparação (D e C) foi a que apresentou as menores distâncias genéticas corrigida sob o modelo Tamura-Nei (0,0028) (Tabela 5), e corroborada com a reconstrução filogenética na qual se observa que são população irmãs (Figura 5), mesmo com suportes moderados.

A deriva genética pode ser a força predominante que governa as frequências alélicas de locais neutros em populações finitas localmente agregadas em *inselbergs* (Macarthur & Wilson, 1967; Hutchinson & Templeton, 1999), como as de *P. azouryi*. A fixação dos haplótipos de cpDNA é um padrão constatado nas angiospermas, incluindo as bromélias, devido a herança uniparental do cpDNA (Wagner *et al.*, 2015), genoma conservado, taxa ausente ou baixa de recombinação, baixos níveis de substituição de nucleotídeos e tempos de coalescência curtos (Adhikari *et al.*, 2017). Logo, espera-se que um tamanho efetivo da população de organelas herdadas matematicamente seja de uma escala de magnitude inferior comparado à dos genes nucleares (como visto em nosso estudo). Assim, sugere-se que a deriva genética desempenhe um papel mais atuante na modelagem das frequências dos alelos das organelas (Birky, 1983).

Portanto, devido a sua natureza disjunta dos *inselbergs*, somado ao fluxo gênico intercambiável reduzido entre populações e atuação da deriva genética, contribuiu para uma elevada diferenciação genética das populações. Mota *et al.* (2020) demonstrou resultados consonantes para *P. flammea* como diversidade genética baixa a moderada dentro das populações, alta estruturação

populacional, fluxo gênico limitado, deriva genética e isolamento de longo prazo com persistência de populações de afloramentos rochosos ao longo das oscilações climáticas do Quaternário.

Forças históricas (flutuações climáticas no Pleistoceno) e populacionais (isolamento por distância e deriva genética) moldaram, de forma dinâmica, uma forte estruturação genética nas populações de *P. azouryi*, de acordo com as nossas estimativas. Ademais, populações Pedra Lisa e Pedra do Baú (agrupamento Rio de Janeiro) demonstraram as populações com as maiores métricas de diversidade genética. Todas as populações foram geneticamente únicas para endossar medidas de conservação da espécie.

Implicações para a conservação

Pitcairnia azouryi é uma espécie que ocorre em sete populações localizadas em *inselbergs* que distam no máximo cerca de 70 km entre elas. Segundo Manhães *et al.* (2016) classificaram *P. azouryi* como espécie em perigo (EN), levando em consideração os critérios da IUCN (2014), como extensão de ocorrência, área de ocupação e número de populações conhecidas.

A ocorrência em ambientes fragmentados (*inselbergs*), com influência da ação antrópica, merece elevada atenção por apresentarem riscos iminentes à diminuição das populações, uma vez que sob tais condições, eventos genéticos como deriva gênica e endocruzamento podem se tornar mais extremos (Franklin *et al.*, 2008).

Diversos fatores em larga escala são comumente associados, tais como o desaparecimento e a degradação dos ambientes naturais causados pela transformação da vegetação nativa em áreas para mineração, desenvolvimento

de infraestrutura, extrativismo ilegal, incêndios e sobre-exploração de espécies de interesse econômico (Martinelli *et al.*, 2008, Martinelli & Moraes, 2013; Loyola *et al.*, 2014).

Apesar do agrupamento Rio de Janeiro (Pedra Lisa e Pedra do Baú) conferir os maiores índices de diversidade genética para *P. azouryi*, todas as populações são prioritárias a conservar o patrimônio genético, uma vez que cada uma possui haplótipos únicos. Além disso, nenhuma das áreas de ocorrência de *P. azouryi* é protegida por unidade de conservação. Este cenário justifica a necessidade de endossar ações prioritárias de conservação para todas as áreas de ocorrência da espécie.

Conclusão

Nossos resultados reiteram na escala temporal histórica de que o agrupamento populacional do Rio de Janeiro (Pedra Lisa e Baú) é o mais antigo, recuperando Pedra Lisa como a mais basal das populações. Encontramos evidências populacionais de que a população Pedra Lisa (Rio de Janeiro) e Pedra do Jacú (Espírito Santo) passaram por eventos de expansão recente e efeito gargalo em algum momento no tempo evolutivo. A atuação da deriva genética via *stepping stones* teve um papel decisivo no estabelecimento e colonização, influenciando a diferenciação genética dessas populações.

Nos parâmetros genéticos populacionais observou-se os maiores índices nas populações do agrupamento Rio de Janeiro. As análises de estruturação genética resultaram em índices elevados de ϕ_{st} ($\phi_{st} > 0,85$) em todas as populações e, conseqüentemente limitado fluxo gênico. As metodologias

analíticas empregadas esclareceram as trajetórias evolutivas desta espécie ameaçada e de ocorrência restrita a sete *inselbergs* da Floresta Atlântica, e apontaram o papel de eventos históricos e de deriva genética via *stepping stones* nos padrões de estruturação populacional da espécie.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, através da taxa de bancada da bolsa de doutorado da estudante Yumi Sheu (Nº: 75388790/2016). Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa, nível 2 concedida às Dras. Tais Cristina Bastos Soares e Tatiana Tavares Carrijo. Ao laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento desse estudo.

Contribuição dos autores

YS, TTC e TCBS projetaram a pesquisa, YS e VCM coletaram os espécimes, YS gerou o banco de dados das sequências, YS e EPM analisaram os dados. Amostras contribuídas por TCBS e FDM. Reagentes fornecidos por TCBS. YS escreveu e todos os outros autores auxiliaram em melhorar a versão final.

Conflito de interesses

Os autores declaram não terem conflitos de interesse.

Referências

- Adhikari S, Saha S, Biswas A, Rana TS, Bandyopadhyay TK, Ghosh P. 2017.** Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus* **60**: 283–297.
- Antonelli A, Sanmartín I. 2011.** Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* **60**: 403-414.
- Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S, Lexer C. 2009.** Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Ann. Bot* **103**: 65– 77.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C. 2007.** Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**: 3759–3767.
- Baresch A, Smith JAC, Winter K, Valerio AL, Jaramillo C. 2011.** *Karatophyllum bromelioides* L.D Gómez revisited: a probable fossil CAM bromeliad. *American Journal of Botany* **98**: 1905–1908.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005.** Haploview: análise e visualização de mapas e LD haplótipos. *Bioinformática* **21**: 263-265.
- Behling H. 1997.** Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). *Rev. Palaeobot. Palynol* **97**: 109–121.
- Behling H. 2002.** South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **177**: 19-27.
- Birky CW. 1983.** Relaxed cellular controls and organelle heredity. *Science* **222**: 468-475.

- Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière 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.
- Bonaccorso E, Koch I, Peterson AT. 2006.** Pleistocene fragmentation of Amazon species 'ranges. *Divers. Distrib* **12**: 157-164.
- Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, Heled J, Kühnert D, De Maio N, Matschiner M, Mendes FK, Müller FN, Ogilvie HA, Du Plessis L, Poppinga A, Rasmussen D, Siveroni I, Suchard MA, Wu CH, Xie D, Zhang C, Stadler T, Drummond AJ. 2019.** BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology* **15**: 1-28.
- Burke, A. 2003.** *Inselbergs* in a changing world – global trends. *Diversity and Distributions* **9**: 375–383.
- Carnaval AC, Moritz C. 2008.** Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J Biogeogr* **35**: 1187-1201.
- Carnaval AC, Waltari E, Rodrigues MT, Rosauer D, VanDerWal J, Damasceno R, Prates I, Strangas M, Spanos Z, Rivera D, Pie MR, Firkowski CR, Bornschein MR, Ribeiro LF, Moritz C. 2014.** Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**: 1792.
- Corander J, Sirén J, Arjas E. 2008.** Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics* **23**: 111-129.
- Corander J, Tang J. 2007.** Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical biosciences* **205**: 19-31.
- Couto DR, Francisco TM, Manhães VC, Dias HM, Pereira MCA. 2017.** Floristic composition of a Neotropical *inselberg* from Espírito Santo state, Brazil: an important area for conservation. *Check List* **13**: 2043.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods. Nature Publishing Group* **9**: 772.

- De Paula LF, Forzza RC, Neri AV, Bueno ML, Porembski S. 2016. Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: A centre of diversity for mat-forming bromeliads on *inselbergs*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 459–476.
- de Paula LF, Leal BS, Rexroth J, Porembski S, Palma-Silva C. 2017.** Transferability of microsatellite loci to *Vellozia plicata* (Velloziaceae), a widespread species on Brazilian *inselbergs*. *Rev Bras Bot* **40**:1071–1075.
- de Paula LF, Azevedo LO, Mauad LP, Cardoso LJT, Braga JMA, Kollmann LJC, Fraga CN, Neto LM, Labiak PH, Mello-Silva R, Porembski S, Forzza RC. 2020.** Sugarloaf Land in south-eastern Brazil: a tropical hotspot of lowland *inselberg* plant diversity. *Biodiversity Data Journal* **8**: e53135.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007.** BEAST : Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 1–8.
- Dynesius M, Jansson R. 2000.** Evolutionary consequences of changes in species 'geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**: 9115–9120.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797.
- Escobedo-Sarti J, Ramírez I, Leopardi C, Carnevali C, Magallón S, Duno R, Mondragon D. 2013.** A phylogeny of Bromeliaceae (Poales, Monocotyledoneae) derived from an evaluation of nine supertree methods. *Journal of Systematics and Evolution* **51**: 743–757.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005.** Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2008.** Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280 p.
- Fu YX. 1996.** New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* **143**: 557–70.
- Fu YX. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915–25.

- Givnish TJ, Barfuss MHJ, EE BV, Riina R, 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.** Genetic structure of Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight- locus plastid phylogeny. *Am J Bot* **133**: 227–234.
- Hedrick PW. 2005.** A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* **59**: 1633–1638.
- Hellberg ME, Burton RS, Neigel JE, Palumbi SR. 2002.** Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* **70**: 273-290.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993.** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **42**: 182–192.
- Hmeljevski KV, Nazareno AG, Bueno ML, Dos Reis MS, Forzza RC. 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**: 4704–4716.
- Honnay O, Jacquemyn H. 2007.** Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Cons Biol* **21**: 823–831.
- Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartín I, Sanchez-Meseguer A, Anderson CL, Figueiredo JP, Jaramillo C, Riff D, Negri FR, Hooghiemstra H, Lundberg J, Stadler T, Särkinen T, Antonelli A. 2010.** Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* **330**: 927.
- Hutchison DW, Templeton AR. 1999.** Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* **53**: 1898-1914.
- Kass RE, Raftery AE. 1995.** Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association* **90**: 773–795.
- Kimura M, Weiss G. H. 1964.** The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* **49**: 561-1964.

- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B. 2016.** PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* **34**: 772–773.
- Ledru MP, Salatino MLF, Ceccantini G, Salatino A, Pinheiro F, Pintaud JC. 2007.** Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Divers. Distrib* **13**: 761–771.
- Leme EMC, Fontana AP, Halbritter H. 2010.** Three New *Pitcairnia* Species (Bromeliaceae) from the Inselbergs of Espírito Santo, Brazil. *Systematic Botany* **3**: 487-496, 2010.
- Loyola R, Machado N, Vila-Nova DA, Martins E, Martinelli G. 2014.** Áreas prioritárias para conservação e uso sustentável da flora brasileira ameaçada de extinção. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. (Acessado: Fevereiro 5, 2020).
- Macarthur RH, Wilson EO. 1967.** A teoria da biogeografia de ilhas. Princeton: Imprensa da Universidade de Princeton.
- Manen J, Savolainen V, Simon P. 1994.** The *atpB* and *rbcl* promoters in plastid DNAs of a wide dicot range. *J. Mol. Evol* **38**: 577–582.
- Manhães VC, Couto DR, Miranda FD, Carrijo TT. 2016.** New findings on the distribution of *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), a species restricted to Atlantic Forest *inselbergs*. *Phytotaxa* **245**: 59-65.
- Manhães VC, Miranda FD, Clarindo WR, Carrijo TT. 2019.** Genetic diversity and karyotype of *Pitcairnia azouryi*: an endangered species of Bromeliaceae endemic to Atlantic Forest *inselbergs*. *Mol Biol Rep* **47**: 179–189.
- Martinelli G, Forzza R.C. 2006.** *Pitcairnia* L’Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L. B. Sm. *Revista Brasil. Bot* **29**: 603-607.
- Martinelli G. 2007.** Mountain biodiversity in Brazil. *Rev. Bras. Bot* **30**: 587-597.
- Martinelli G, Moraes MA. 2013.** *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio.

- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC. 2008.** Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodrigueésia* **59**: 209–258.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010.** *Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees*. Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA pp 1 – 8.
- Miller MP. 2005.** Alleles in Space (AIS). A computer program for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* **96**: 722-723.
- Mota MR, Pinheiro F, Leal BSS, Sardelli CH, Wendt T, Palma-Silva C. 2020.** From micro- to macroevolution: insights from a Neotropical bromeliad with high population genetic structure adapted to rock outcrops. *Heredity*. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0342-8>.
- Nei M, Kumar S. 2000.** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press.
- Palma – Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbara T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C. 2011.** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical *inselbergs*. *Molecular Ecology* **20**: 3185–3201.
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA. 2000.** Neotropical seasonally dry forests and Pleistocene vegetation changes. *Journal of Biogeography*. **27**: 261-273.
- Porembski S. 2007.** Tropical *inselbergs*: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 579- 586.
- Porembski S, Barthlott W. 2000.** Granitic and gneissic outcrops (*inselbergs*) as centers of diversity for desiccationtolerant vascular plants. *Plant Ecology* **151**: 19–28.
- Porembski S, Becker U, Seine R. 2000.** Islands on islands: habitats on *inselbergs*. In: Porembski S, Barthlott W, eds. *Inselbergs – biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions*, vol. 146. Berlin: Ecological Studies, Springer-Verlag.

- Rambaut A. 2008.** FIGTREE v1.2. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut A, Drummond A, Xie D, Baele G, Suchard MA.** Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology* **67**: 901- 904.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Rozas J, Rozas R. 1999.** DNASP, version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**: 174–175.
- Safford HD. 1999.** Brazilian páramos I: an introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* **26**: 693–712.
- Scarano FR. 2002.** Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. *Annals of Botany* **90**: 517– 524.
- Schubert K. 2017.** *Systematik und Evolution der Gattung Pitcairnia L'Heritier (Bromeliaceae)*. Universität Kassel.
- Schulte K, Horres R, Zizka G. 2005.** Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). *Senckenbergiana Biologica* **85**: 113–125.
- Schütz N, Krapp F, Wagner N, Weising K. 2016.** Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 323-342.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**: 275–288.
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita NJ, Obokata K, Yamaguchi-Shinozaki C, Ohto K, Torazawa BY, Meng M, Sugita H, Deno T, Kamogashira K, Yamada J, Kusuda F, Takaiwa A, Kato N, Tohdoh H, Shimada H, Sugiura M. 1986.** The complete

nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO Journal* **5**: 2043–2049.

Silva GAR, Antonelli A, Lendel A, Moraes EM, Manfrin MH. 2017. The impact of early Quaternary climate change on the diversification and population dynamics of a South American cactus species. *Journal of Biogeography* **45**: 76–88.

Speziale KL, Ezcurra C. 2012. The role of outcrops in the diversity of Patagonian vegetation: Relicts of glacial palaeofloras? *Flora* **207**: 141-149.

Stamatakis A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312-3.

Tapper SL, Byrne M, Yates, CJ, Keppel G, Hopper SD, Niel KV, Schut AGT, Mucina L, Waderll-johnson AW. 2014. Prolonged isolation and persistence of a common endemic on granite outcrops in both mesic and semi-arid environments in south-western Australia. *Journal of Biogeography* **41**: 2032-2044.

Tajima, F. 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* **143**: 1457–1465.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.

Templeton AR. 1980. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* **94**: 1011–1038.

Turchetto-Zolet AC, Turchetto C, Cruz F, Turchetto C, Cruz F, Veto NM, Barros MJF, Segatto ALA, Freitas LB, Margis R. 2016. Phylogeography and ecological niche modelling in *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) suggest distinct vegetational responses to climate change between the southern and the northern Atlantic Forest. *Bot J Linn Soc* **182**: 670–688.

- Thiers B. 2020.** Índice Herbariorum: Um diretório global de herbários público e pessoal associado. Herbario Virtual do Jardim Botânico de Nova Iorque. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>. (Acessado: Agosto 24, 2020).
- Wagner ND, Wöhrmann T, Burmeister A, Weising K. 2015.** Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: a case study in *Fosterella* (Pitcairnioideae). *Plant Systematics and Evolution* **301**: 2231–2246, 2015.
- Willems RJ, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sirén J, Hanage WP, Corander J. 2012.** Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* **3**: 1-12.
- Wright S. 1943.** Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114-138.
- Xia X, Xie Z. 2001.** DAMBE: data analysis in Molecular Biology and evolution. *Journal of Heredity* **92**: 371–373.

Lista de Tabela

Tabela 1. Número de amostras totais das populacionais da espécie *P. azouryi*.

De acordo com a localidade, formações rochosas, coordenada geográfica e número de indivíduos coletados respectivamente.

Tabela 2. *Primers* foram testados e utilizados para a amplificação e sequenciamento neste estudo.

Cada *primer* apresentado contém a fonte de origem e a temperatura de anelamento (°C).

Tabela 3. Panorama geral dos dados genéticos dos marcadores cloroplastidiais.

pb = quantidade de pares de base; N = número de amostras amplificadas; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; k = proporção de sítios polimórficos.

Tabela 4. Regiões geográficas referentes a cada grupo filogenético obtida pela análise do BAPS.

Foram plotadas cores referentes a cada agrupamento e região geográfica

Tabela 5. Matriz de distância genética (distância-p) par-a-par calculada para os grupos filogenéticos.

Cálculo é feito baseado na distância genética corrigida pelo modelo Tamura-Nei dentro dos grupos, respectivamente.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA), comparando as diferentes variações entre e dentro dos grupos filogeográficos.

ϕ_{st} : estimador do índice de fixação total dos grupos

Tabela 7. Valores do índice de fixação (ϕ_{st}).

Estimados par-a-par entre os grupos filogenéticos ao nível $p > (0,05)$

Tabela 8. Parâmetros genéticos calculados para cada grupo populacional, sendo: n = número de indivíduos.

S = número de sítios segregantes; h = número de haplótipos; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica; k = número de sítios polimórficos; *D* de Tajima e *F_s* de Fu = testes de desvio de neutralidade, os números em negrito representam os valores estatísticos significantes ($p < 0,05$ para *D* de Tajima e $p \leq 0,02$ para *F_s* de Fu).

Tabela 1

Populações	Localidades	Formações rochosas	Coordenada geográfica	Número de indivíduos
1	Pedra Lisa, Burarama/ES	monólito	20°42'04" S 41°18'34" W	15
2	Pedra do Jacu, Burarama/ES	monólito	20°43'19" S 41°20'20" W	11
3	Pedra das Andorinhas/ES	Complexo Pedra das Andorinhas	20°46'19" S 41°21'12" W	12
4	Pedra Três Irmãs/ES	Complexo Pedra das Andorinhas	20°47'26" S 41°21'34" W	13
5	Pedra Parada Cristal/ES	Complexo Pedra das Andorinhas	20°47'39" S 41°22'20" W	13
6	Pedra do Baú /RJ	Complexo Pedra do Baú	21°20'32" S 41°22'26" W	13
7	Pedra Lisa, Campos/ RJ	Complexo Pedra do Baú	21°20'36" S 41°24' 09" W	13
Total	-	-	-	90

Tabela 2

Locus	Primers	T°	Fonte
atpB-rbcL	5'GAAGTAGTAGGATTGATTCTC 3' 5'TACAGTTGTCCATGTACCAG 3'	56	Manen <i>et al.</i> , (1994)
matk	5'ATACCCTGTTCTGACCATATTG 3' 5'GGTTCCAGAAGATGTTAATCG 3'	54	Schutle <i>et al.</i> , (2005)
psaB-psbH	5'AGATGTTTTTGCTGGTATTGA 3' 5'TTCAACAGTTTGTGTAGCCA 3'	56	Shinozaki <i>et al.</i> , (1986)
rpl32-trnL	5'CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC 3' 5'CTACTTCCTAAGAGCAGCGT 3'	58	Shaw <i>et al.</i> , (2007)

rpS16 – 5'AAAGTGGGTTTTTATGATCC 3' 58 Shaw *et al.*, (2007)
trnK 5'TTAAAAGCCGAGTACTCTACC 3'

Tabela 3

Gene	pb	N	h	Hd	$\pi\%$	k
atpB-rbcL	727	90	9	0,617	0,42%	11
matk	753	90	9	0,744	0,17%	9
psaB-psbH	608	90	4	0,461	0,30%	7
rpl32-trnL	671	90	7	0,651	0,32%	11
rpS16 –trnK	703	90	7	0,829	0,33%	6

Tabela 4

Cor	Grupos filogenéticos	Localidades e Região Geográfica
Vermelho	A	Pedra Lisa, Burarama, Cachoeiro de Itapemirim, ES
Amarelo	B	Pedra Três Irmãs, Jeronimo Monteiro, ES
Rosa	C	Pedra das Andorinhas, Cachoeiro de Itapemirim, ES
Cinza	D	Pedra Parada Cristal, Jeronimo Monteiro, ES
Laranja	E	Pedra do Jacu, Burarama, Cachoeiro de Itapemirim, ES
Azul	F	Pedra Lisa, Campos de Goytacazes, RJ
Roxo	G	Pedra do Baú, Campos de Goytacazes, RJ

Tabela 5

	A	B	C	D	E	F	G
A	*						
B	0,00061	*					
C	0,00057	0,00061	*				
D	0,00086	0,00090	0,00028	*			
E	0,00266	0,00271	0,00209	0,00238	*		
F	0,00670	0,00675	0,00612	0,00641	0,00697	*	

G 0,00762 0,00702 0,00703 0,00733 0,00676 0,00505 *

Tabela 6

Fonte de variação dos grupos filogenéticos	Entre os grupos	Dentro dos grupos
cpDNA (Fst = 0,97746)		
Varição dos componentes	14,19520 Va	0,32740Vb
Percentual de variação (%)	97,75%	2,25%

Tabela 7

	A	B	C	D	E	F	G
A	*						
B	0,90282	*					
C	0,85078	0,90261	*				
D	0,91568	0,94033	0,85253	*			
E	0,93056	0,94185	0,91350	0,93889	*		
F	0,98696	0,98801	0,98790	0,98974	0,98301	*	
G	0,98452	0,98526	0,98555	0,98751	0,97937	0,95551	*

Tabela 8

Grupos	n	S	h	Hd	π	k	D de Tajima	Fs de Fu
A	15	0	3	0	0	0	0	-0,6433
B	13	2	4	0,299	0,00009	2	-1,46801	-2,20607
C	12	0	2	0	0	0	0	0,73482
D	13	0	2	0	0	0	0	0,24043
E	11	3	5	0,385	0,00020	4	-1,79996	-2,22932
F	13	5	5	0,538	0,00030	5	-1,86311	-2,44337
G	13	6	4	0,423	0,00033	6	-1,78488	-0,40627

Lista de Figura

Figura 1. Distribuição geográfica das sete localidades de ocorrência de *P. azouryi*.

(1) Pedra Lisa-Burarama; (2) Pedra do Jacú; (3) Pedra das Andorinhas; (4) Pedra Três Irmãs; (5) Pedra Parada Cristal; (6) Pedra do Baú e (7) Pedra Lisa-Campos.

Figura 2. Gráfico das transições e transversões (eixo y) em função da diversidade nucleotídica (eixo x), calculada sob o modelo Tamura-Nei (1984).

As transições são representadas pelas linhas de coloração azul e a transversões pelas linhas de cor verde.

Figura 3. Árvore gênica concatenada (cpDNA) por máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB).

Em cada ramo das árvores, é exibido os valores de *bootstrap* (*bs*) e *probabilidade posteriori* (*pp*), respectivamente.

Figura 5. Panorama integrativo da dinâmica evolutiva de *P. azouryi*.

(A) Árvore de linhagens resultante das análises filogenéticas. Os valores de *pp* estão representados com bolinhas vermelhas ($pp < 90\%$) e pretas ($pp > 90\%$) conforme indicado na figura. Cada agrupamento está identificado e associada ao resultado do *Barplot* gerado pela análise do BAPS representada na figura pela coluna à direita. B) Distribuição geográfica das amostras utilizadas neste trabalho. Os pontos representam as populações amostradas e as cores dos círculos correspondem à coloração atribuída de acordo com o BAPS e a filogenia. C) Rede de haplótipos dos marcadores cloroplastidiais concatenados

Figura 6. Correlação entre a distância genética no eixo Y e a distância geográfica no eixo X.

Há evidências de alguma relação estatística significativa ($p > 0,05$).

Figura 1

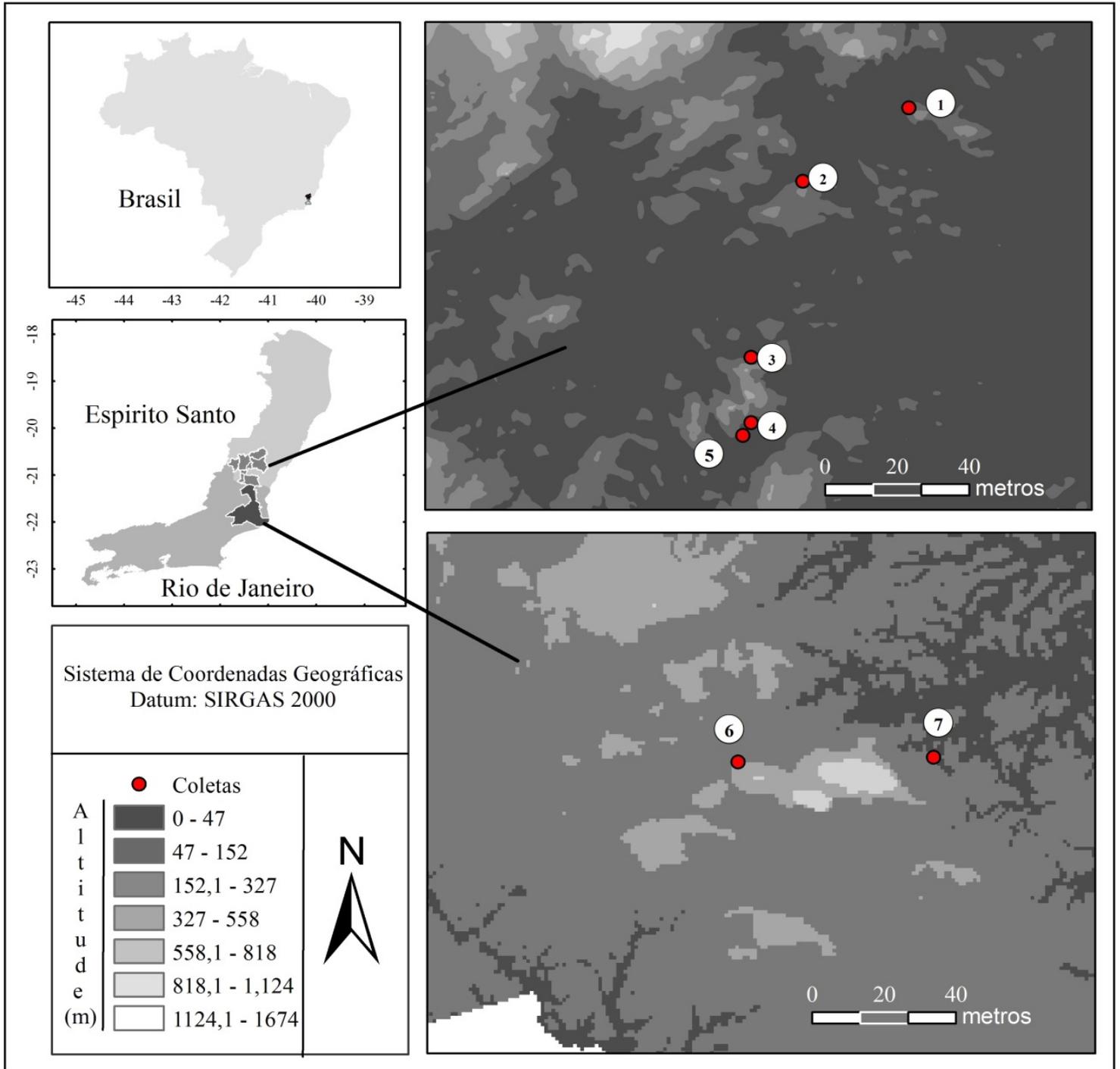


Figura 2

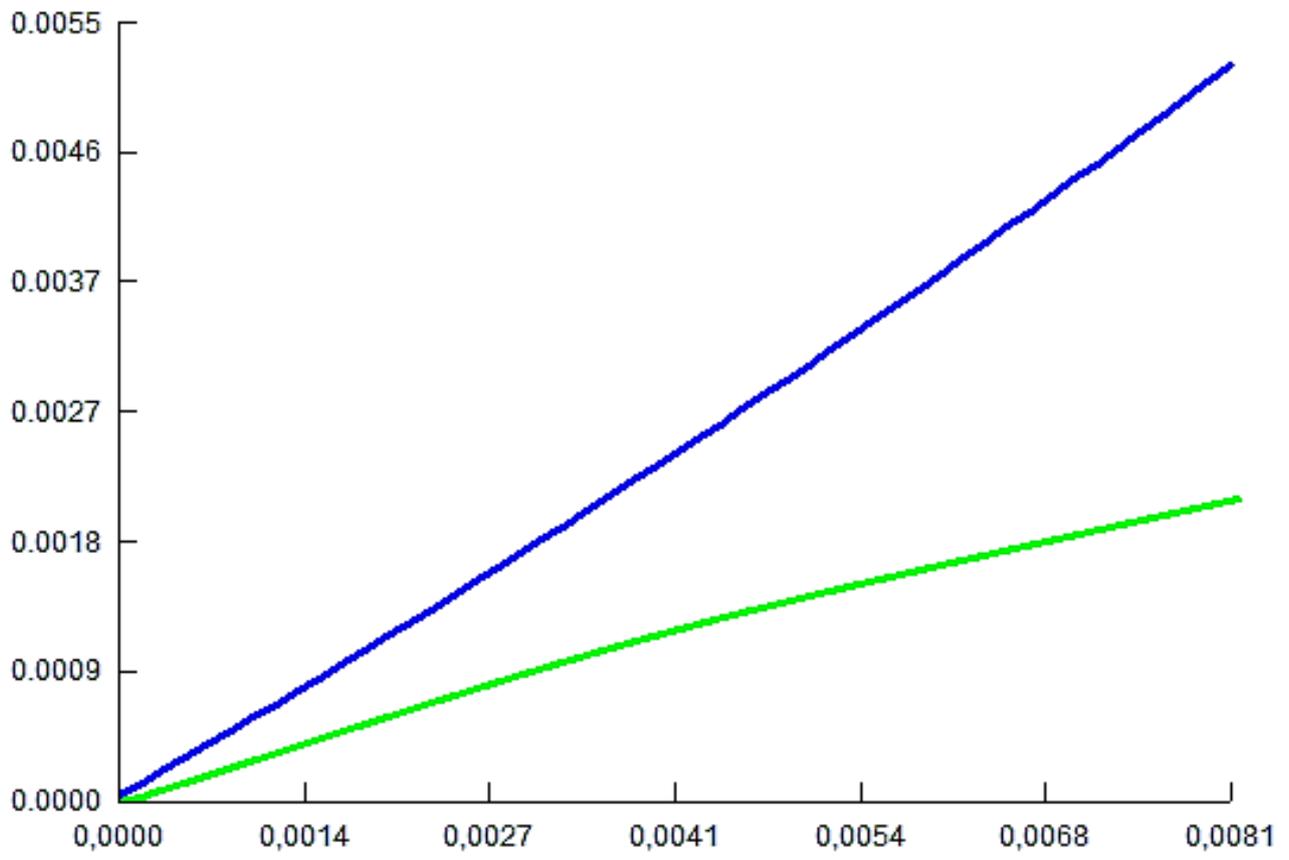


Figura 3

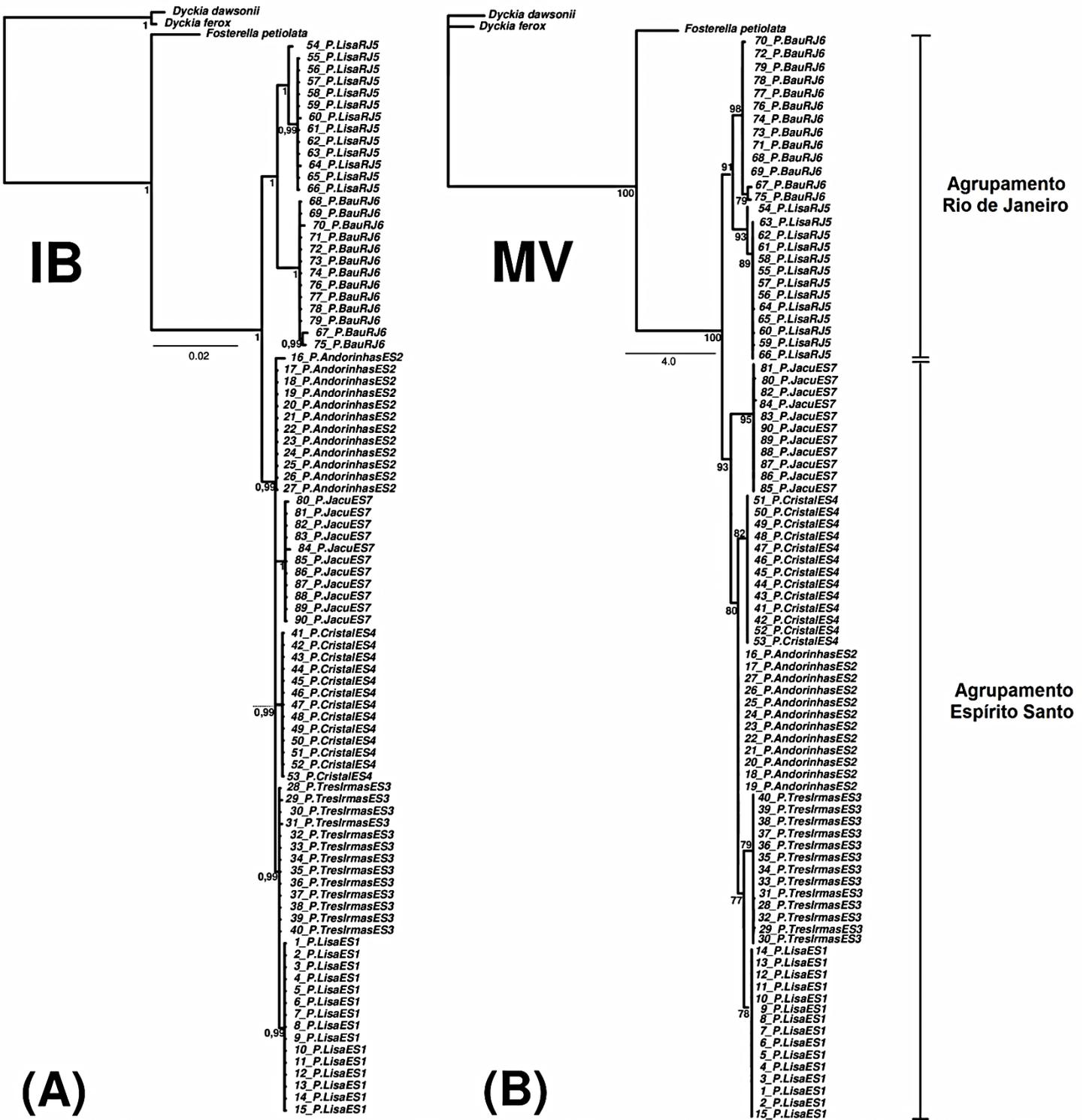


Figura 4

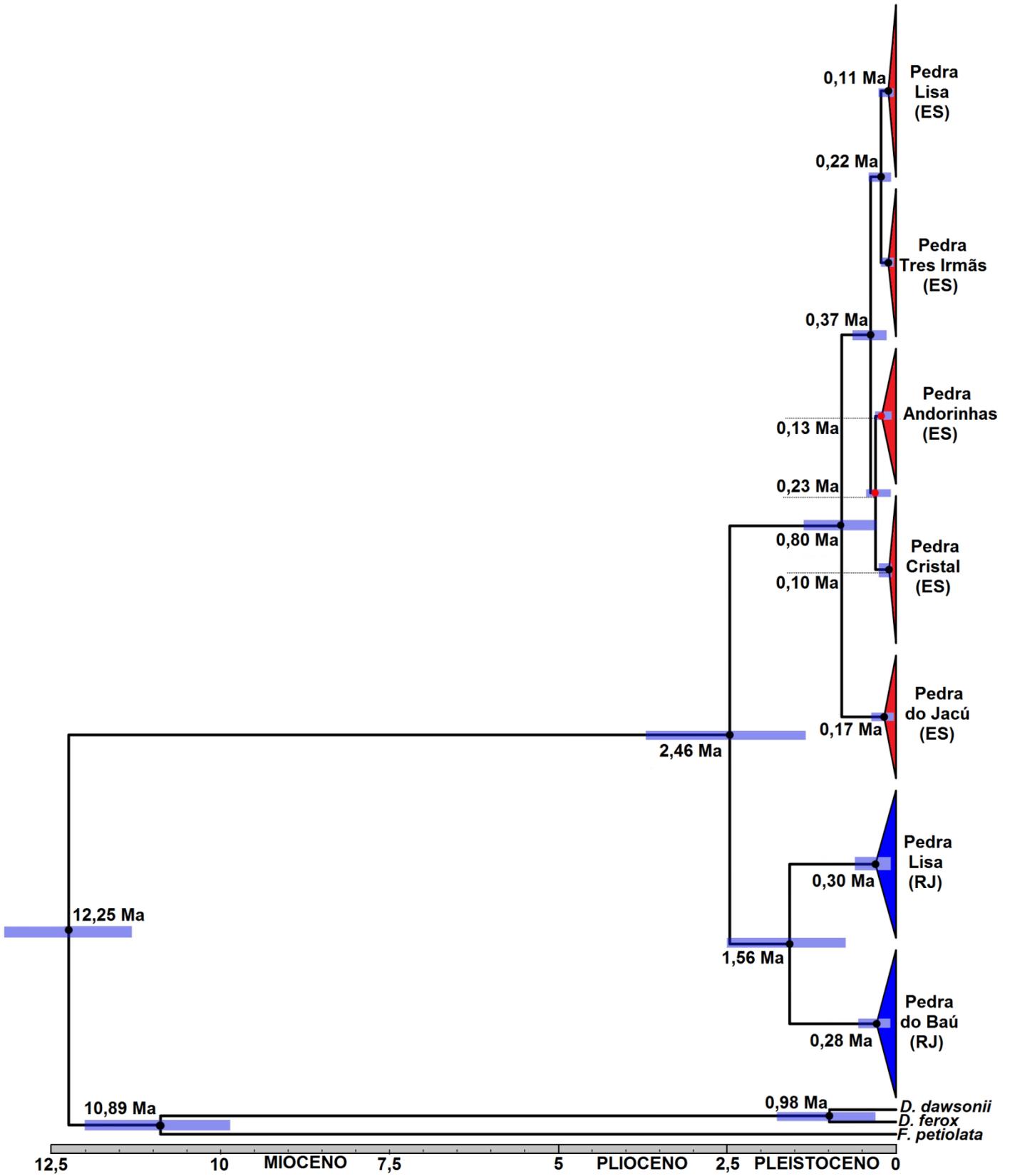


Figura 5

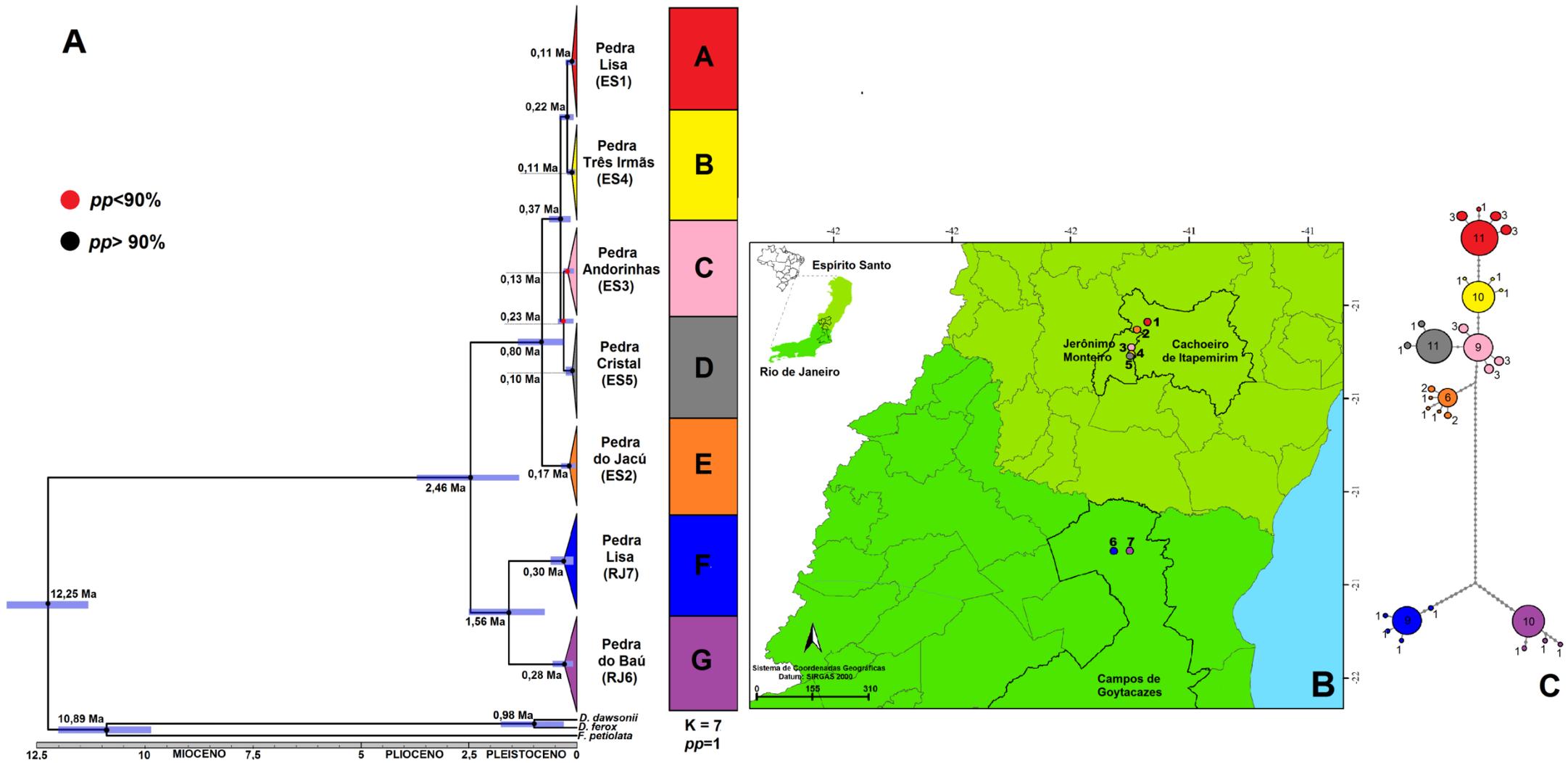
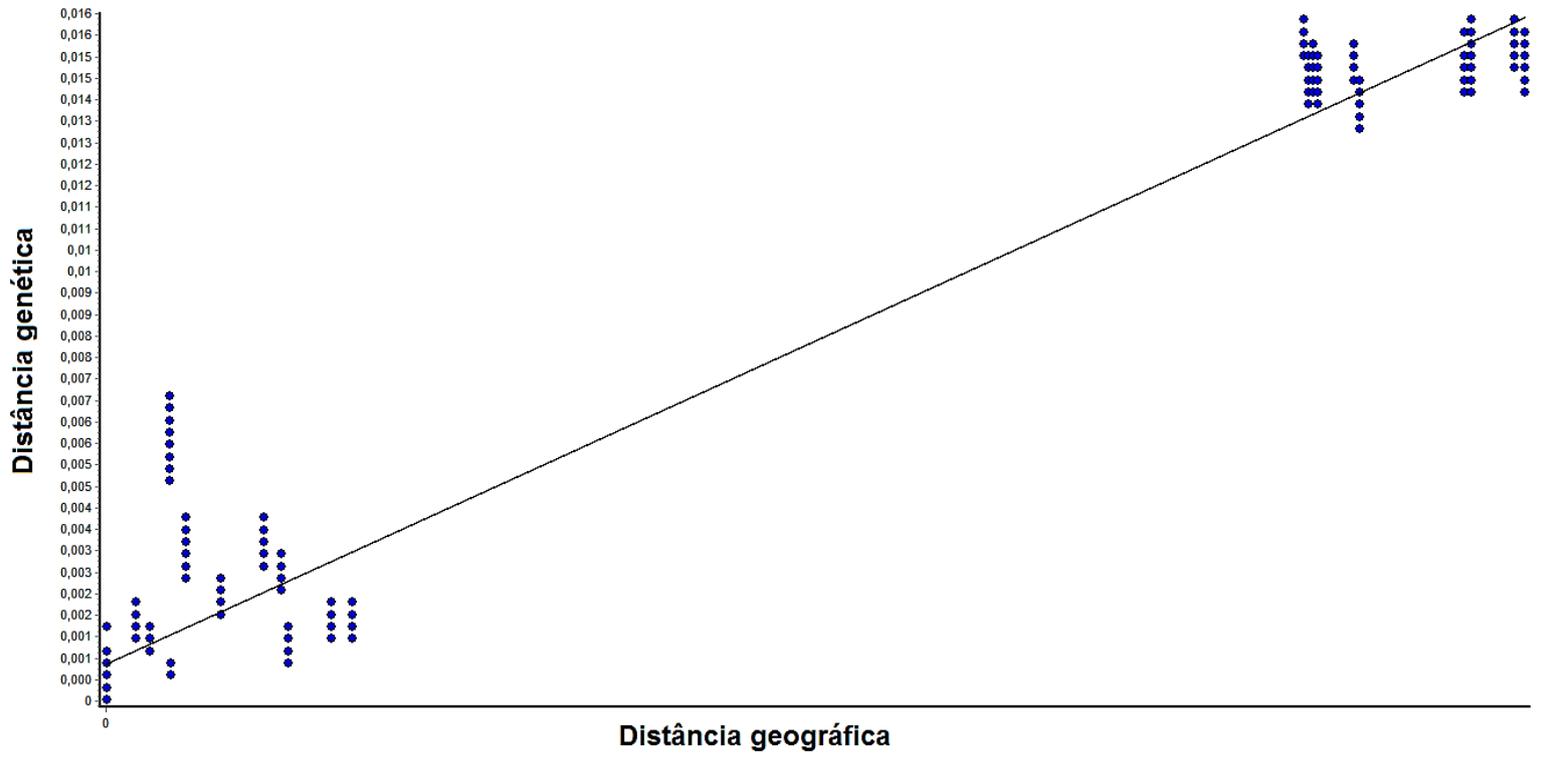
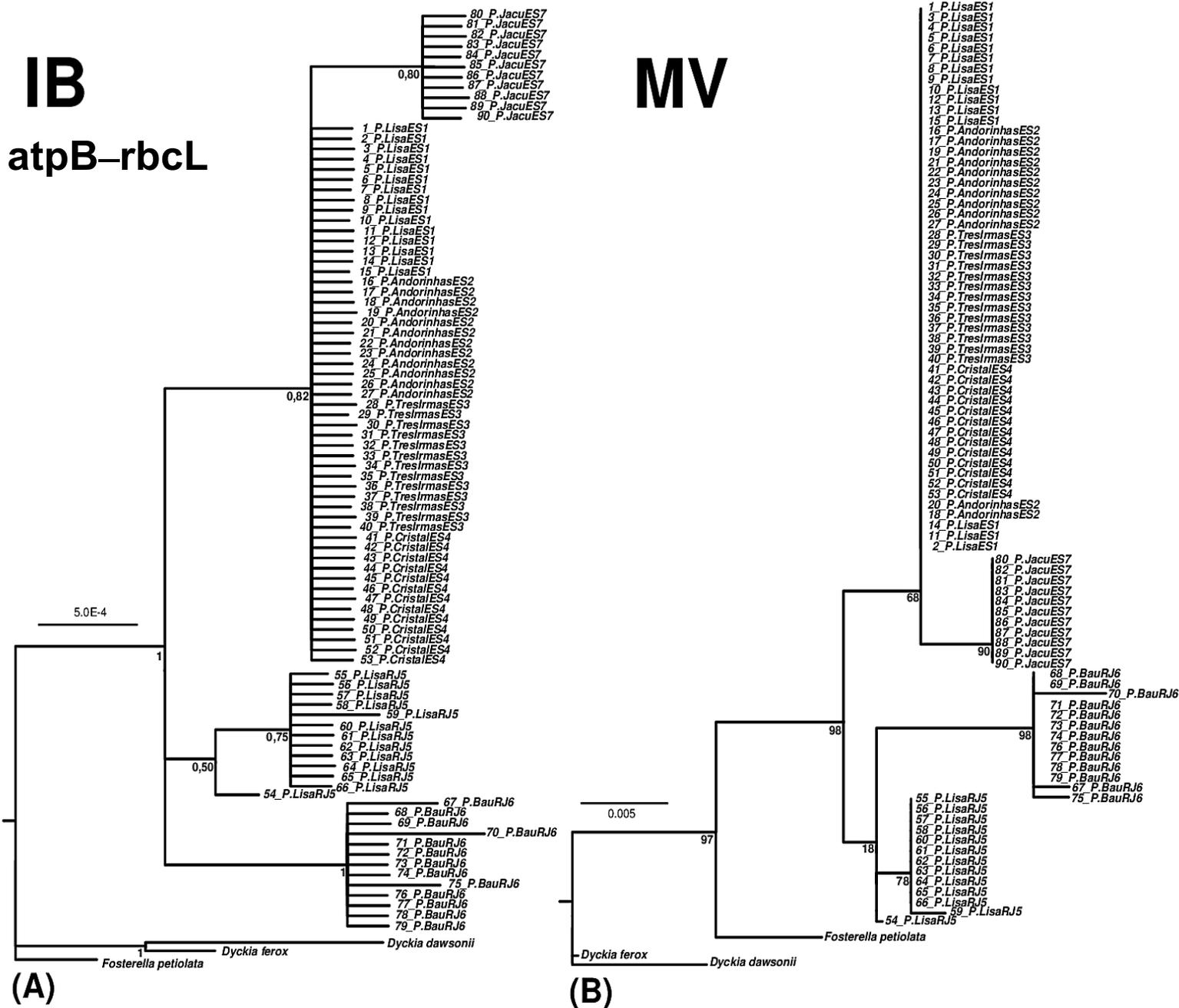


Figura 6



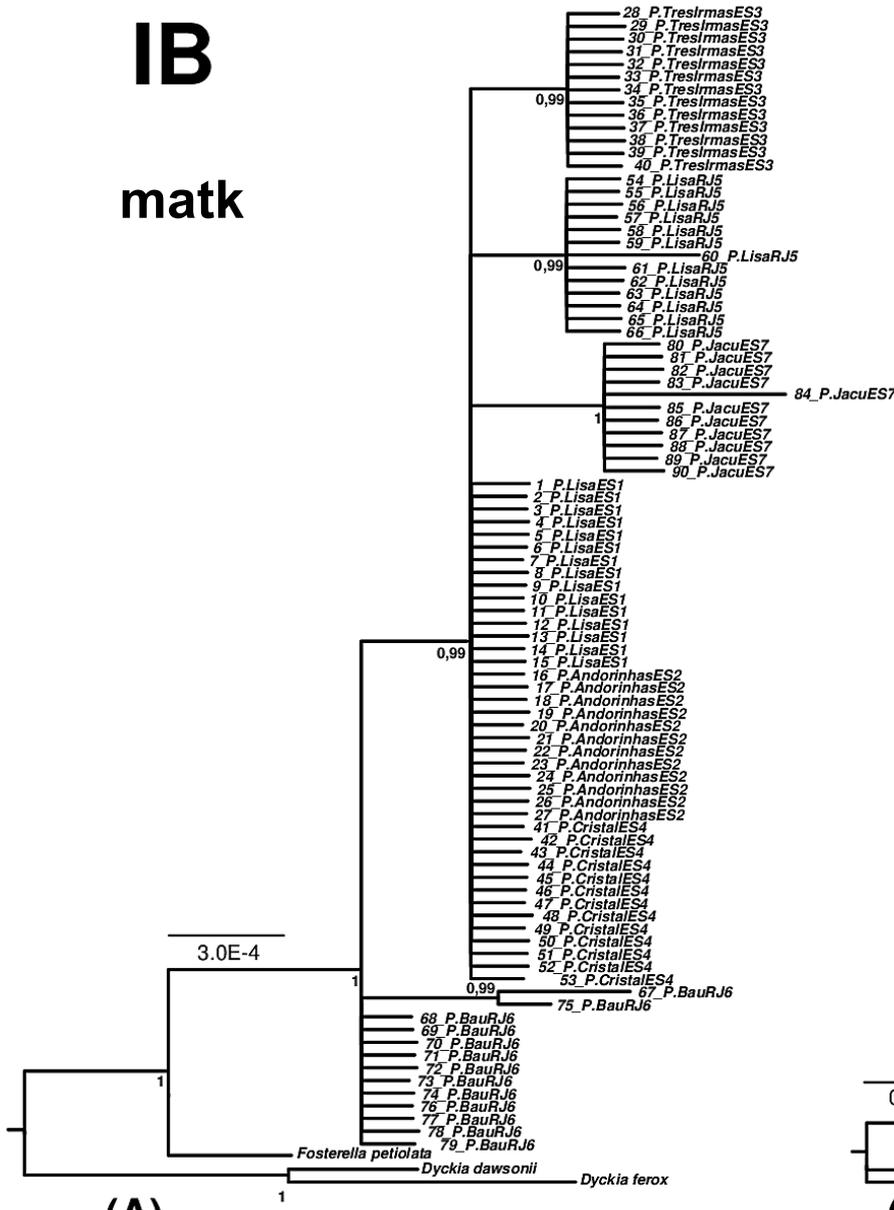
Material Suplementar

Figura S1. Árvores gênicas individuais geradas por inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (MV). A partir das sequências concatenadas dos marcadores nucleares: atpB-rbcL, matk, psaB – psbH, rpl32 – trnL e rpS16 – trnK, respectivamente.

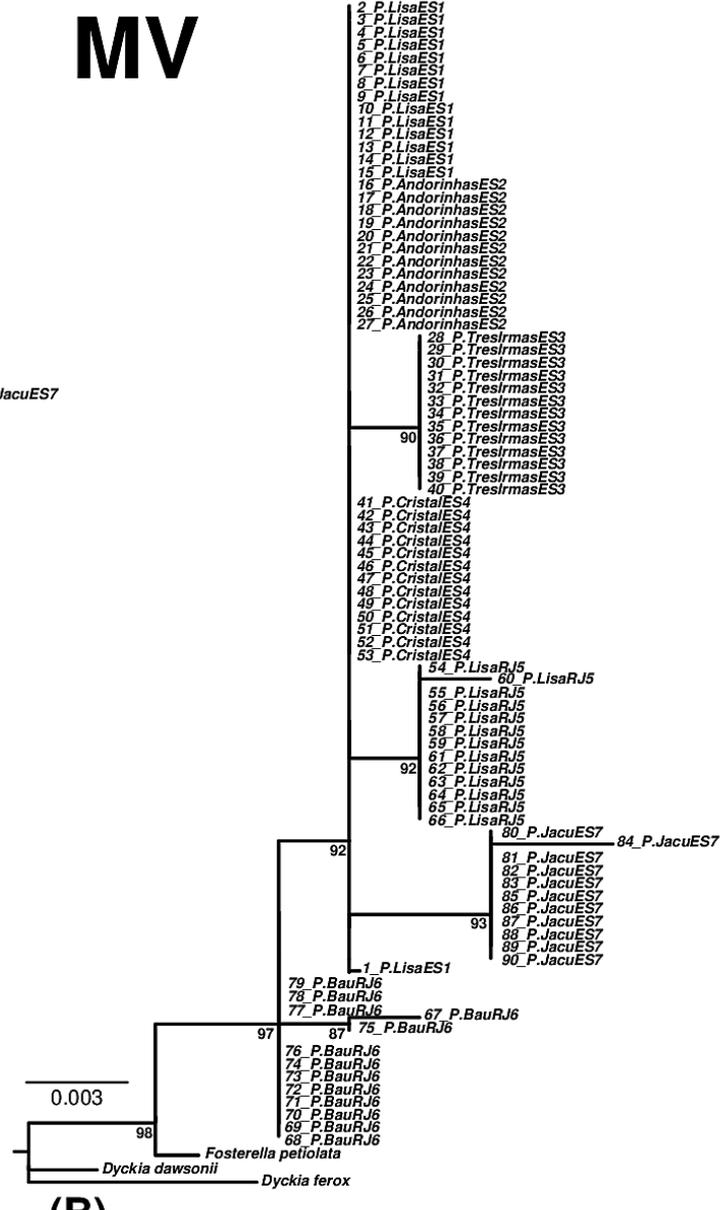


IB

matk

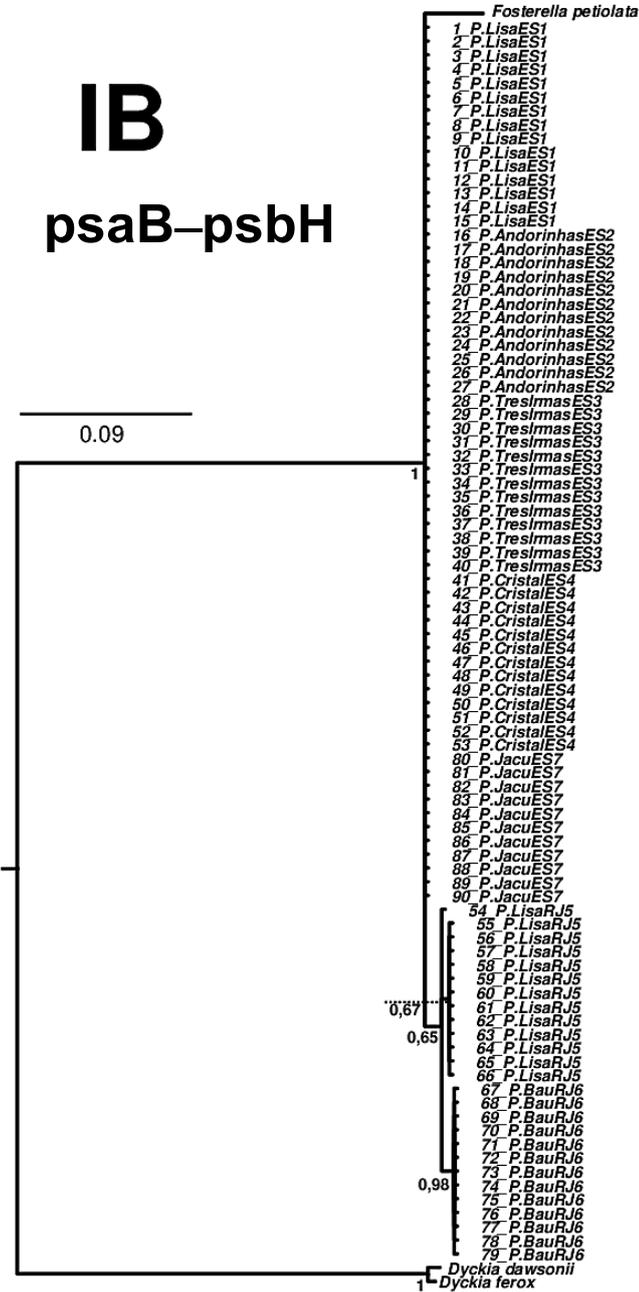


MV



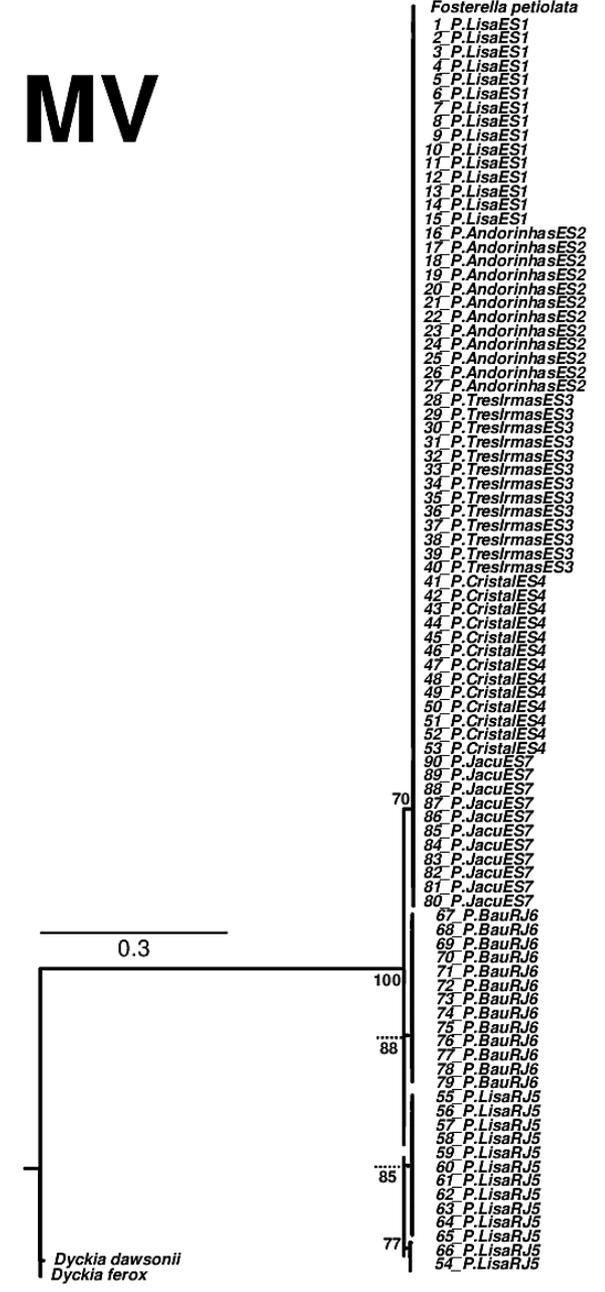
IB

psaB-psbH



(A)

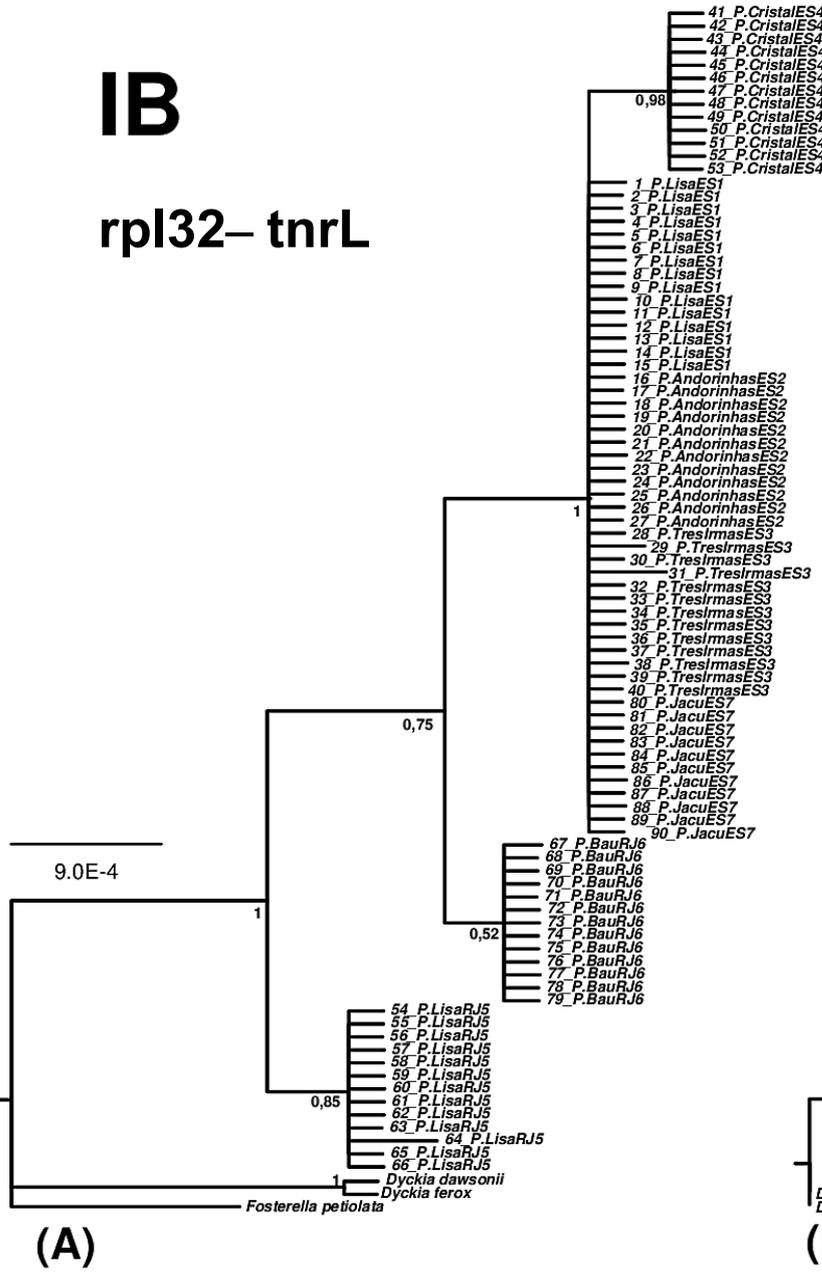
MV



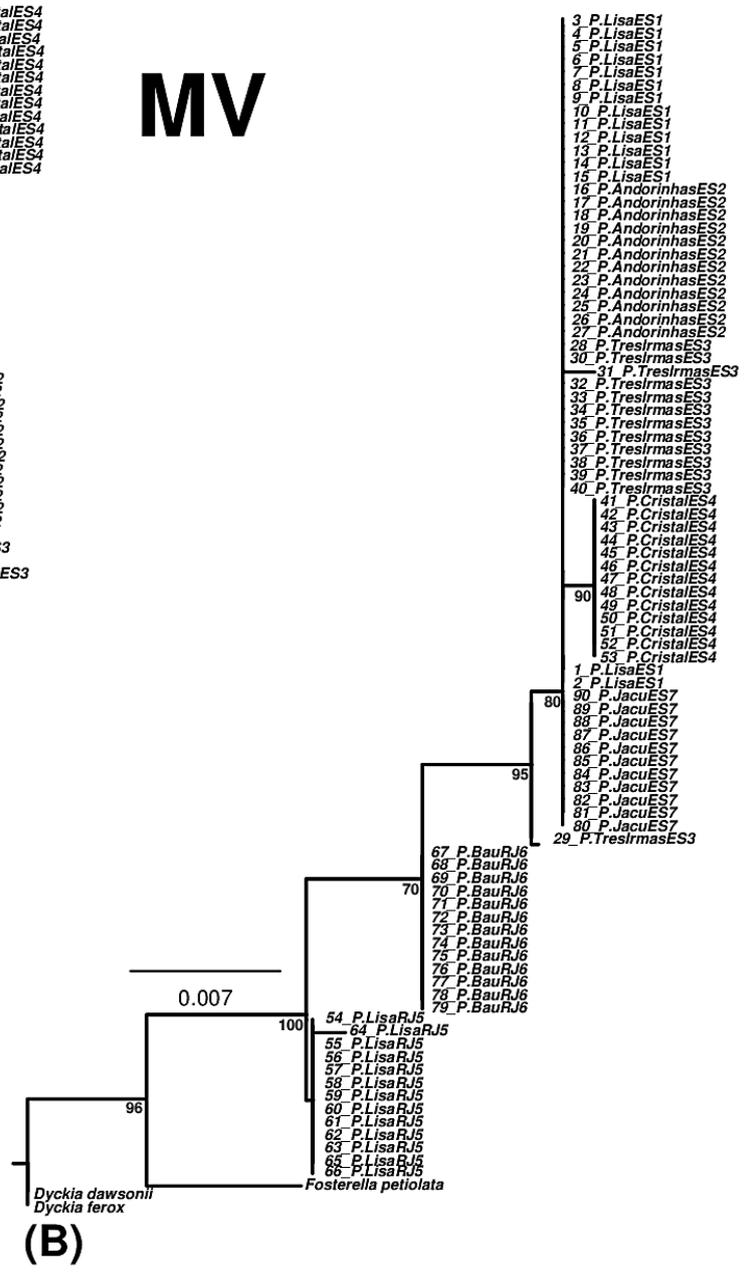
(B)

IB

rpl32-tnrL

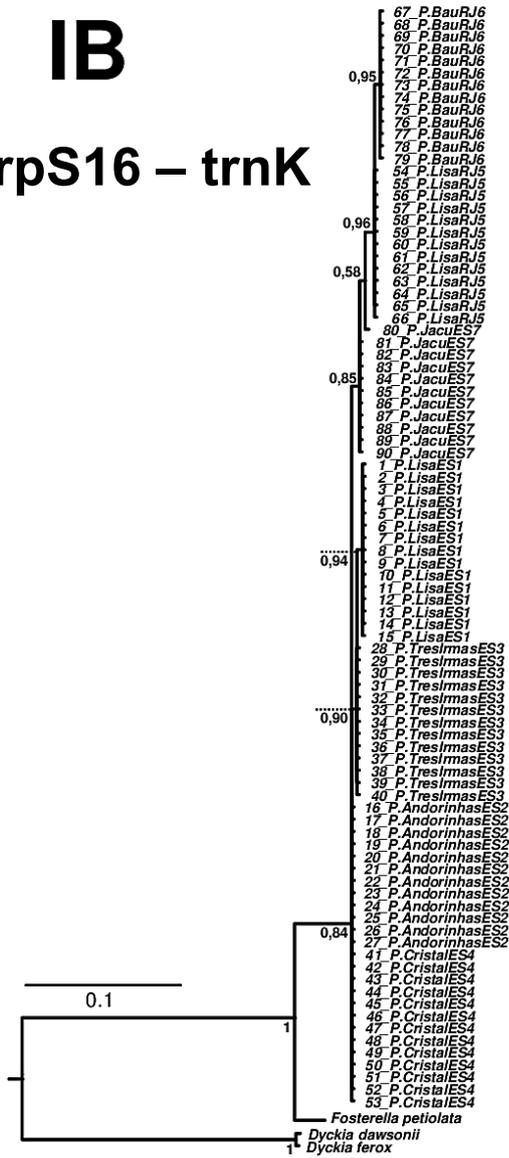


MV



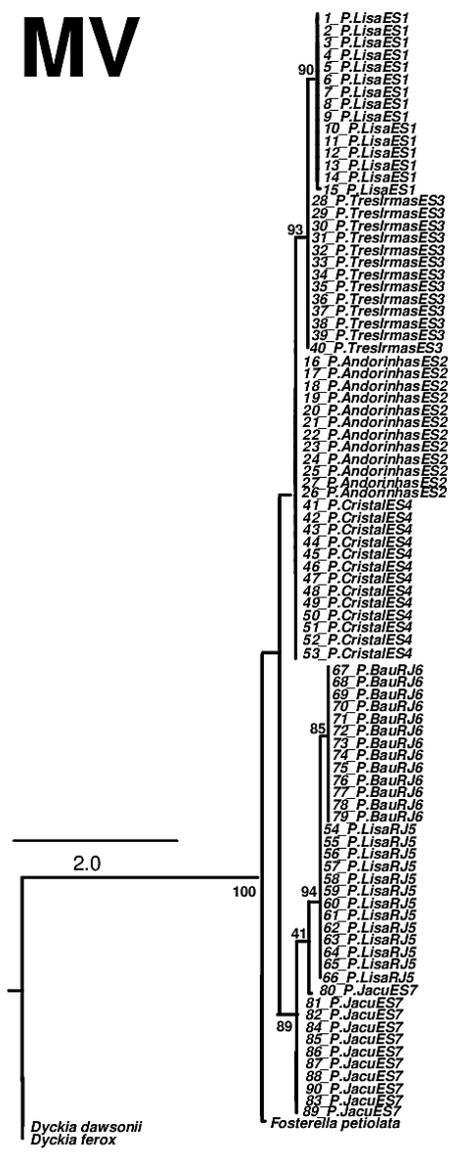
IB

rpS16 – trnK



(A)

MV



(B)

Figura S2. Redes de haplótipos construídas para os cinco marcadores utilizados no estudo: (A) *atpB-rbcL*; (B) *matk*; (C) *psaB-psbH*; (D) *rpl32-trnL* e (E) *rpS16-trnK*. As cores correspondem à coloração dos grupos expostos na figura 5. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos de cada haplótipo. Os pontos intermediários (círculos cinza) referem-se ao número de passos mutacionais entre as populações. Para facilitar a visualização foi indicado, em alguns segmentos, o número total de mutações.

