

A photograph of a plant stem with a cluster of small white flowers and a moth-like insect on a leaf. The background is black.

**MARIA IZABEL SILVA DE LIMA PAIVA**

**ESTUDOS MOLECULARES NO GRUPO  
“*ORTHOPHYTUM DISJUNCTUM*”: UM  
CASO DE MICROENDEMISMO EM UMA  
PORÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL**

**RECIFE  
2023**

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

**MARIA IZABEL SILVA DE LIMA PAIVA**

**ESTUDOS MOLECULARES NO GRUPO “Orthophytum  
disjunctum”: Um caso de microendemismo em uma porção do nordeste  
do Brasil**

**RECIFE-PE**

**2023**

**MARIA IZABEL SILVA DE LIMA PAIVA**

**ESTUDOS MOLECULARES NO GRUPO “*Orthophytum  
disjunctum*”: Um caso de microendemismo em uma porção do nordeste  
do Brasil**

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

Área de concentração: Sistemática e  
Evolução

Linha de pesquisa: Florística e Sistemática de

Angiospermas.

Orientador: Rafael Batista Louzada

**RECIFE-PE**

**2023**

# FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva  
CRB4/1381

Paiva, Maria Izabel Silva de Lima.

Estudos moleculares no grupo no "*Orthophytum disjunctum*": Um caso de microendemismo em uma porção nordeste do Brasil. / Maria Izabel Silva de Lima Paiva – 2023.

62 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Rafael Batista Louzada

Mestrado (dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - PPGBV da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Coalescência. 2. Delimitação. 3. Filogenia. 4. Marcadores moleculares. 5. *Orthophytum disjunctum*.  
I. Louzada, Rafael Batista. (Orient.). III. Título.

580

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-006

**MARIA IZABEL SILVA DE LIMA PAIVA**

**ESTUDOS MOLECULARES NO GRUPO “Orthophytum  
disjunctum: Um caso de microendemismo em uma porção do nordeste  
do Brasil**

**Aprovada em: 27/09/2023**

**Área de concentração: Sistemática e Evolução**

**Dissertação apresentada à Banca Examinadora:**

---

**Rafael Batista Louzada -UFPE**

**Orientador**

---

**JEFFERSON RODRIGUES MACIEL - UFRPE**

**1º Examinador**

---

**Diego Sotero de Barros Pinangé - UFAM**

**2º Examinador**

**RECIFE-PE**

**2023**

*A minha mãe Maria Alice Silva de  
Lima Paiva, você é meu exemplo de  
bondade e força.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente que permitiu que eu chegasse até aqui;

Ao meu Orientador Rafael Batista Louzada, por toda contribuição, ensinamentos, auxílio no campo, a ajuda durante todo o processo e compreensão sempre que precisei. Muito Obrigada professor!

Aos meus amigos, Larissa Morais, Joilson, Amanda, Yuri Rossine, Larissa Maia, Yuri Couceiro, William, Gustavo Gomes. Obrigada por tanto, não existem palavras que aqui eu possa descrever, sempre serei grata por esse laço que criamos;

A minha família, em especial a Maria Alice Silva de Lima (Mãe), Maria José Silva (Avó) e Maria do Socorro Bento de Paiva (Avó), vocês sempre serão meus exemplos de honestidade, força e bondade;

Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genômica de Plantas (LEEG) e em especial a minha coorientadora Clarisse Palma-Silva por todo o suporte concedido a mim durante o meu curso e durante meu estágio na Unicamp e a Paulo Aécio, que forneceu imensas contribuições ao trabalho e a minha formação como pesquisadora que sou hoje

A república “Divas” de Barão Geraldo pelo acolhimento e cuidado que vocês meninas tiveram comigo, espero vê-las em breve;

Aos membros da Banca Jefferson Rodrigues Maciel e a Diego Sotero de Barros Pinangé pelas contribuições e compreensão para o trabalho aqui apresentado;

Ao professor Marccus Alves por todo apoio e partilha de conhecimento durante esses anos que estive no MTV;

Ao laboratório de Morfo-Taxonomia e Evolução Vegetal (MTV) e a todos os colegas de trabalho que já passaram pelo laboratório e de alguma maneira contribuíram para a minha formação profissional;

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Prospecção e Gestão da Biodiversidade do Nordeste (NPGBio).

Aos meus amigos da graduação Lucas Andrade, Camila Alves e Lucas Marques, por permanecerem até hoje e por sempre se mostrarem dispostos a ajudar quando preciso;

Ao meu namorado Vitor Guilherme pela compreensão, carinho e cuidado comigo nessa etapa, obrigada por cuidar tão bem de mim, amo você.

Aos meus sogros Eugênia Valéria e Willans Wanderley pela atenção que me deram durante essa etapa.

## RESUMO

As relações das espécies com seus ancestrais, assim como os limites existentes entre as entidades são alguns dos principais pontos de debate do pensamento biológico. Dado que a especiação nem sempre é acompanhada por mudanças morfológicas conspícuas, os estudos que apresentam abordagens moleculares são capazes de auxiliar na compreensão de espécies consideradas problemáticas quanto a sua delimitação. Bromeliaceae Juss. é uma família de monocotiledôneas, inserida na ordem Poales. Com a maior parte de sua distribuição Neotropical, a família é representada por ervas perenes, com rosetas de eixo curto e, raramente, com caule alongado, com intensa reprodução sexuada. No Brasil, são aceitas 1.387 espécies e 56 gêneros, dos quais 1.187 e 34 gêneros são endêmicos do país. O gênero *Orthophytum*, da família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae, é endêmico do Brasil, apresenta 54 espécies e ocorre em afloramentos rochosos, com dois principais centros de diversificação (Minas Gerais e Bahia). Sua atual hipótese filogenética postula que os clados se distribuem de maneira biogeográfica. O grupo “*Orthophytum disjunctum*” é aqui denominado da seguinte forma devido a sobreposição dos caracteres morfológicos e semelhança na distribuição e representado pelos táxons *O. disjunctum*, *O. jabrense*, *O. atalaiense* e *O. triumfense*. Aqui, propomos a reconstrução parcial da filogenia de *Orthophytum* incluindo as quatro espécies que compõem o complexo e testamos a delimitação das entidades pertencentes ao grupo “*Orthophytum disjunctum*”, com base na abordagem GMYC, através de dados moleculares de marcadores plastidiais e nucleares. Os nossos resultados recuperaram as relações de parentesco do grupo e corroboram estudos prévios que indicam o gênero como monofilético contudo, as relações recuperadas para o gênero não se apresentam completamente congruentes com atual hipótese filogenética, de maneira que as relações intraespecíficas, dentro desses clados, não estão bem suportadas e os limites existentes entre as entidades precisam ser melhor investigados.

**Palavras-Chave:** Coalescência, Delimitação, Filogenia, Marcadores moleculares, *Orthophytum disjunctum*.



## ABSTRACT

The relationships between species and their common ancestors, as well as the boundaries that exist between entities, are some of the main points of debate in biological thought. Given that speciation is not always accompanied by morphological changes, studies employing molecular approaches are capable of aiding in the understanding of species considered problematic in terms of their delimitation. Bromeliaceae Juss. is a family of monocotyledons, included in the Poales order, with the majority of its distribution in the Neotropical region. The family is represented by perennial herbs with rosettes having a short axis and, rarely, an elongated stem, with intense sexual reproduction. In Brazil, 1,387 species and 56 genera are accepted, of which 1,187 species and 34 genera are endemic to the country. The genus *Orthophytum*, from the Bromeliaceae family, subfamily Bromelioideae, is endemic to Brazil, comprising 54 species and occurring in rocky outcrops, with two main centers of diversification in Minas Gerais and Bahia. Its current phylogenetic hypothesis suggests that clades are distributed in a biogeographical manner. The group referred to as the "*Orthophytum disjunctum*" group is named as such due to the overlapping of morphological characters and similarity in distribution. It includes the taxa *O. disjunctum*, *O. jabrense*, *O. atalaiense*, and *O. triunfense*. In this study, we propose the partial reconstruction of the *Orthophytum* phylogeny, including the four studied species, and test the delimitation of the entities belonging to the "*Orthophytum disjunctum*" group using the GMYC approach, based on molecular data from plastid and nuclear markers. Our results recovered the kinship relations of the group and support previous studies that indicate the genus as monophyletic. However, the relationships recovered for the genus are not entirely congruent with the current phylogenetic hypothesis, and the intraspecific relationships within these clades are not well-supported. The existing boundaries between entities need further investigation

**Keywords:** Coalescence, Delimitation, Molecular markers Phylogeny, *Orthophytum disjunctum*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES DISSERTAÇÃO

<b>Figura 1.</b> Espécies pertencentes ao grupo “ <i>Orthophytum disjunctum</i> ” .....	17
<b>Figura 2.</b> Distribuição geográfica das espécies do grupo “ <i>Orthophytum disjunctum</i> ” e classificação das áreas de distribuição .....	19
<b>Figura 3.</b> Filogenia proposta para Bromeliaceae. Adaptado de Givnish <i>et al.</i> , (2011).....	21
<b>CAPÍTULO I - ESTUDOS MOLECULARES NO GRUPO “<i>Orthophytum disjunctum</i>”: Um caso de microendemismo em uma porção do nordeste do Brasil</b>	
<b>Figura 1.</b> Árvore da Análise de Máxima Verossimilhança baseada em dados nucleares e plastidiais ( <i>trnH-psbA</i> , <i>trnL-trnF</i> e PHYC) .....	46
<b>Figura 2.</b> Resultado da análise de delimitação de espécies utilizando o modelo de limiar único GMYC .....	47
<b>Figura 3.</b> Comparação entre as diferentes abordagens derivadas da análise GMYC e análise Bayesiana.....	48

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Espécies do grupo “*Orthophytum disjunctum*” coletadas para o estudo..... 49
- Tabela 2.** Tabela de vouchers das amostras utilizadas no estudo, adaptada de Louzada *et al.* (2014) .....50
- Tabela 3.** Tabela dos pontos de coleta utilizados para as análises de coalescência, onde táxon representa as entidades amostradas no estudo, seguido por localidade onde as populações foram amostradas, os estados onde se encontram essas populações e por fim, latitude e a longitude, representando as coordenadas geográficas..... 51

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA BROMELIACEAE.....	14
2.2. O GÊNERO <i>Orthophytum</i> .....	16
2.3. BREVE ABORDAGEM FILOGENÉTICA EM BROMELIACEAE.....	20
2.4. COALESCÊNCIA E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES .....	22
3. OBJETIVOS .....	25
<b>CAPÍTULO I - Estudos moleculares no grupo “<i>Orthophytum disjunctum</i>”: Um caso de microendemismo em uma porção Nordeste do Brasil .....</b>	<b>27</b>
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
5. REFERÊNCIAS .....	

## APRESENTAÇÃO

O gênero *Orthophytum* (subfamília Bromelioideae), descrito por Beer (1954), é endêmico do Brasil e ocorre em ambientes rochosos, apresentando 54 espécies formalmente descritas. Os principais estudos em *Orthophytum* dividiram o gênero em dois grupos informais com base na característica da inflorescência, que se apresentava como escaposa ou séssil. No entanto, essa proposição subgenérica não se manteve até o momento atual. Atualmente o grupo é considerado como monofilético. As espécies de *Orthophytum* geralmente habitam o topo de *inselbergs* granítico nas regiões da Mata Atlântica e da Caatinga, e afloramentos de arenito quartzítico nos Campos Rupestres brasileiros, ao longo da Cadeia do Espinhaço e se destaca por microendemismos. o grupo “*Orthophytum disjunctum*” é composto por *Orthophytum disjunctum* L.B. Sm., *Orthophytum atalaiense* J.A.Siqueira & Leme, *Orthophytum jabrense* G.S.Baracho & J.A.Siqueira e *Orthophytum triunfense* J.A.Siqueira & Leme, aqui considerado como grupo devido as suas relações morfológicas e geográficas.

Sendo assim, a dissertação está dividida em duas partes: Fundamentação Teórica e Capítulo I. Na Fundamentação Teórica, serão apresentados tópicos com informações a respeito da família Bromeliaceae, do gênero *Orthophytum* e das espécies do grupo “*Orthophytum disjunctum*”, uma breve abordagem sobre a filogenética em Bromelioideae e uma abordagem sobre a coalescência e os estudos baseados em delimitação de espécies.

O capítulo I, refere-se ao manuscrito intitulado como “Estudos moleculares no grupo “*Orthophytum disjunctum*”: Um caso de microendemismo em uma porção Nordeste do Brasil” , foram agrupados dados que reconstruíram as relações ancestrais do grupo, com o objetivo de testar seu monofiletismo, além de dados de delimitação de espécies com abordagens coalescentes, mas esses resultados por si só não obtiveram sucesso em delimitar as espécies do grupo. O manuscrito referente ao capítulo I será submetido para publicação no periódico *Brazilian Journal of Botany*

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Espécies são unidades fundamentais de comparação em todos os ramos da biologia (De Queiroz, 2005). O seu reconhecimento, delimitação e descrição constituem um longo e controverso debate nos campos da sistemática e evolução (Pinheiro et al., 2018). A importância das espécies na biologia deriva de sua importância na sistemática, que é responsável pelo arcabouço taxonômico usado em todas as áreas da biologia. (De Queiroz, 2005). De Queiroz (2007) propõe um conceito de espécie unificado definindo-a como segmentos de linhagens em constante evolução separada, tratando todas as propriedades anteriormente usadas como necessárias, mas não definidoras da categoria de espécies, trazendo assim uma melhor definição para o conceito.

Para explorar os limites e hipóteses de especiação entre aquelas linhagens intimamente relacionadas, o conceito de linhagem geral das espécies pode ser usado como estrutura conceitual para testar a utilidade de critérios adotados, no contexto da taxonomia integrativa (Pessoa et al., 2012). As árvores genéticas desempenham um papel fundamental nesse contexto, sendo frequentemente empregadas na inferência dos limites entre espécies, em que um parâmetro genético é aplicado para delinear-las (Knowles & Carstens, 2007). Além disso, as árvores filogenéticas podem ser empregadas para entender as relações evolutivas entre grupos que estão intimamente relacionados. As espécies de Bromeliaceae há muito tempo atraem pesquisadores dedicados a compreender como os processos históricos e ecológicos influenciam a macro e a microevolução nesta família de monocotiledôneas (Palma-Silva et al., 2016).

Bromeliaceae agrupa cerca de 3.744 espécies, divididas em 82 gêneros e oito subfamílias (Givnish et al. 2007; 2011; Gouda *et al.*, 2023, em constante atualização). As bromélias são nativas de regiões tropicais e subtropicais dos Neotrópicos estendendo-se até a Virgínia na América do Norte e ao norte da Patagônia na América do Sul (Smith & Till, 1998). Com exceção de *Pitcairnia feliciana* (A.Chev.) Harms & Mildbr, que é endêmica no continente africano o (Smith & Downs 1974). No Brasil ocorrem 1.387 espécies e 56 gêneros da família (Forzza et al. 2020). Considerada como a segunda família com maior número de táxons ameaçados de extinção no Brasil, sendo a primeira em número de espécies criticamente em perigo - CR. (Forzza et al. 2022).

Bromelioideae é a segunda maior subfamília, com 974 espécies e 33 gêneros, sendo 15 deles endêmicos do Brasil (Leme et.al, 2017). Um desses gêneros endêmicos do Brasil é

*Orthophytum* Beer (1854) (Louzada et al. 2014), apresentam cerca de 54 espécies e é considerado um gênero endêmico do Brasil (Louzada, 2020), distribuídas em habitats secos e/ou ensolarados, em rochas constantemente úmidas, pastagens em solos rochosos no cerrado, entre rochas ou em afloramentos rochosos dentro da Caatinga de mata seca, bem como nos domínios da Mata Atlântica e Cerrado (Versieux; Leme, 2007). No presente trabalho o grupo “*Orthophytum disjunctum*” composto por *Orthophytum disjunctum* L.B. Sm. *Orthophytum atalaiense* J.A.Siqueira & Leme, *Orthophytum jabrense* G.S.Baracho & J.A.Siqueira e *Orthophytum triunfense* J.A.Siqueira & Leme, se destaca por ser endêmico da porção oriental do Nordeste do Brasil. Sendo aqui postulado como grupo devido a sobreposição de alguns caracteres morfológicos e consequente dificuldade na delimitação morfológica das espécies e sua relativa proximidade em áreas de ocorrência.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA BROMELIACEAE

Bromeliaceae Juss. é uma família de monocotiledôneas, inserida na ordem Poales (APG IV, 2016). Atualmente, são representadas por cerca de 3.755 espécies, divididas em 82 gêneros (Gouda et al., 2023, em constante atualização) e oito subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae s.s., Puyoideae e Bromelioideae (Givnish et al. 2007). A família possui uma distribuição amplamente neotropical, com exceção de uma única espécie: *Pitcairnia feliciana* (A.Chev.) Harms & Mildbr, nativa do oeste do continente africano (Smith & Downs, 1974). As espécies são encontradas em regiões tropicais e subtropicais dos Neotrópicos, estendendo-se até a Virgínia, nos Estados Unidos, na América do Norte, e ao norte da Patagônia, na Argentina, na América do Sul (Smith & Till, 1998).

A família é representada por ervas perenes, com rosetas de eixo curto e, raramente, com caule alongado, com intensa reprodução sexuada. Elas possuem raízes absorventes quando crescem em ambientes terrícolas, incluindo rupícolas que se modificam para raízes de sustentação quando são epífitas ou epilíticas. As inflorescências podem ser simples ou compostas, fortemente ramificadas ou adensadas, as flores são trímeras e geralmente hermafroditas, podendo ser sésseis ou pediceladas, com brácteas coloridas e vistosas (Wanderley et al., 2007). A posição do ovário pode ser súpero, semi-ínfero ou ínfero, e o fruto pode ser do tipo baga ou cápsula (Wanderley et al., 2007). Como sinapomorfias, a família

apresenta tricomas peltados (escamas) absorventes de água, estigma conduplicado espiralado e número básico de cromossomos  $x=25$  (Brown & Gilmartin 1986, 1989). O aparato reprodutivo é menos diverso, e as espécies predominantemente apresentam flores bissexuais (Castante-Marín et al., 2020).

No Brasil, são aceitas 1.387 espécies e 56 gêneros, onde 1.187 e 34 gêneros são endêmicos do país, distribuídas por todos os domínios fitogeográficos do país (Forzza et al. 2020). O país apresenta a maior riqueza específica desse grupo, sendo a Floresta Atlântica e o Cerrado, principalmente nas áreas de afloramentos rochosos e Campos Rupestres, os domínios brasileiros com o maior número de táxons (BGF, 2020). A família é a segunda com maior número de táxons ameaçados de extinção no Brasil, sendo a primeira em número de espécies criticamente em perigo - CR. (Forzza et.al, 2022). Representa ainda, um importante componente florístico e fisionômico em diferentes formações vegetais, com representantes de formas de vida terrícola, epífita ou rupícola (Versieux, 2008).

Suas folhas alternas espiraladas formam uma roseta basal que forma um tipo de cisterna, capaz de acumular água e conseqüentemente formar microecossistemas (Judd et al., 2009). Onde, altos níveis de riquezas nas florestas são particularmente associados com a presença de bromélias tanque que se desenvolvem nos galhos e nos ramos das árvores (Siqueira Filho, 2003). As suas flores vistosas são polinizadas por diversos tipos de insetos, aves, morcegos ou até ocasionalmente alguns roedores (Judd et al., 2009). De forma que, a ornitofilia predomina a polinização na família, representada em sua maioria pelos beija-flores (Tagliati et al., 2018).

São largamente utilizadas no paisagismo mas, sem dúvida alguma, seu exemplar mais conhecido e apreciado pela sua relevância econômica é o abacaxi *Ananas comosus* (L.) Merrill ( Forzza et.al, 2022). *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez por sua vez, conhecida como "caroá-verdadeiro", é amplamente utilizada na produção de fibras, além disso, na medicina natural, suas propriedades digestivas são reconhecidas (Moreira et al, 2006). É importante ressaltar o valor ornamental significativo desse grupo botânico, que se destaca por suas diversas e belas inflorescências. Conseqüentemente, muitas espécies da família estão severamente ameaçadas, especialmente pela perda de habitat e extrativismo ilegal (Forzza et.al, 2022). Outra aplicação notável na indústria envolve a enzima "bromelina", que está presente em algumas espécies do gênero *Bromelia* (Moreira et al., 2006).



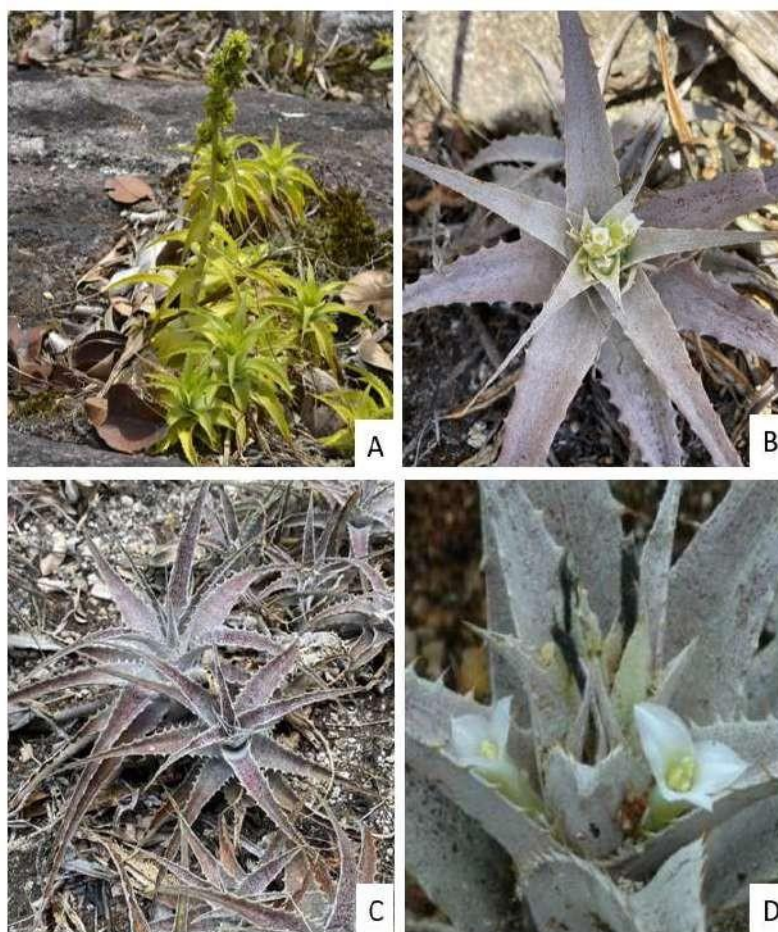
## 2.2. O GÊNERO *Orthophytum* Beer

O gênero foi descrito por Beer (1954) considerando o material com inflorescência pedunculada coletada por Mez no Brasil e nomeado de *Orthophytum glabrum* Beer (Louzada & Wanderley, 2010). Apesar das descrições morfológicas apresentadas por Smith & Downs (1955, 1979), diversas lacunas ainda persistem no conhecimento das espécies do gênero. Os principais estudos em *Orthophytum* dividiram o gênero em dois grupos informais com base na característica na inflorescência, que se apresentava como escaposa ou sésstil (Leme, 2004; Louzada & Wanderley 2010; Smith 1955, 1966; Smith & Downs 1979). Em uma série de estudos morfológicos acerca do gênero *Orthophytum*, Leme (2004), dividiu os dois complexos em subcomplexos, o primeiro agrupava os de inflorescências pedunculadas: *disjunctum*, *leprosum e mello-barretoii*, e o segundo de inflorescências sésseis: *amoenum, vagas e suphutih*.

No entanto, essa proposição subgenérica não se manteve até o momento atual, pois pesquisas subsequentes mostraram que o agrupamento *suphutih* por exemplo, deveria ser considerado como um gênero distinto, sendo nomeado de *Lapanthus* (Louzada & Versieux, 2010). Um outro subgrupo denominado por Leme (2004) de *Amoenum* foi confirmado como monofilético e foi reestabelecido como *Sincorea* Ule (Louzada & Wanderley, 2016). Silvestro et al. (2014) consideraram *Orthophytum* como um grupo polifilético, com espécies sendo encontradas em duas linhagens distintas. Todavia, Louzada et al. (2014) apresentaram uma filogenia molecular de 39 espécies do gênero confirmando o seu monofiletismo com várias linhagens com elevado suporte dentro do gênero, esclarecendo conseqüentemente, parte das relações infragenéricas.

*Orthophytum* Beer pertence a Bromelioideae e este é endêmico do Brasil, ocorre em ambientes rochosos (Siqueira- Filho & Leme, 2007) e apresenta 54 espécies, contudo existem controvérsias em relação ao número real (Louzada, 2020). Apresenta uma relação morfológica e filogenética com os gêneros: *Lapanthus* Louzada & Versieux, *Sincorea* Ule e *Crypthantus* Otto & A.Dietr. Os centros de diversificação do grupo se encontram na região Sudeste e Nordeste nos estados de Minas Gerais e Bahia, respectivamente (Siqueira Filho & Leme, 2007). As espécies de *Orthophytum* geralmente habitam o topo de *inselbergs* granítico nas regiões da Mata Atlântica e da Caatinga, e afloramentos de arenito quartzítico nos Campos Rupestres brasileiros, ao longo da Cadeia do Espinhaço (Louzada et al., 2014). O gênero se destaca por sua alta proporção de microendemismos, sendo a maioria das espécies restrita a

uma ou duas localidades (Louzada & Wanderley, 2010). São plantas terrícolas ou rupícolas, caulescentes ou curto caulescentes com folhas dispostas em formato de roseta, apresentando em geral lâminas com margem serrilhada e forma triangular (Baracho & Siqueira-Filho, 2004).



**Figura 1.** Espécies pertencentes ao grupo “*Orthophytum disjunctum*”: (A) *Orthophytum atalaiense* J.A.Siqueira & Leme, Serra da Násceia - AL; (B) *Orthophytum jabrense* G.S.Baracho & J.A.Siqueira, Pico do Jabre - PB; (C) *Orthophytum disjunctum* L.B. Sm, Serra de São Bento - RN e (D) *Orthophytum triumfense* J.A.Siqueira & Leme Pico do Papagaio-PE. Fonte: A autora (2023).

*Orthophytum disjunctum* L.B.Sm. (Figura 1C) é uma espécie rupícola que se propaga assexuadamente por brotações na base da roseta, possui de 20-50 cm de altura (Louzada, 2012), e por brotos originados no ápice da inflorescência (Siqueira Filho; Leme, 2007). É caracterizada principalmente pelo indumento densamente lepidoto em ambas as faces das lâminas foliares e brácteas e o pedúnculo alongado com inflorescência em espigas laxas (Louzada, 2012). A

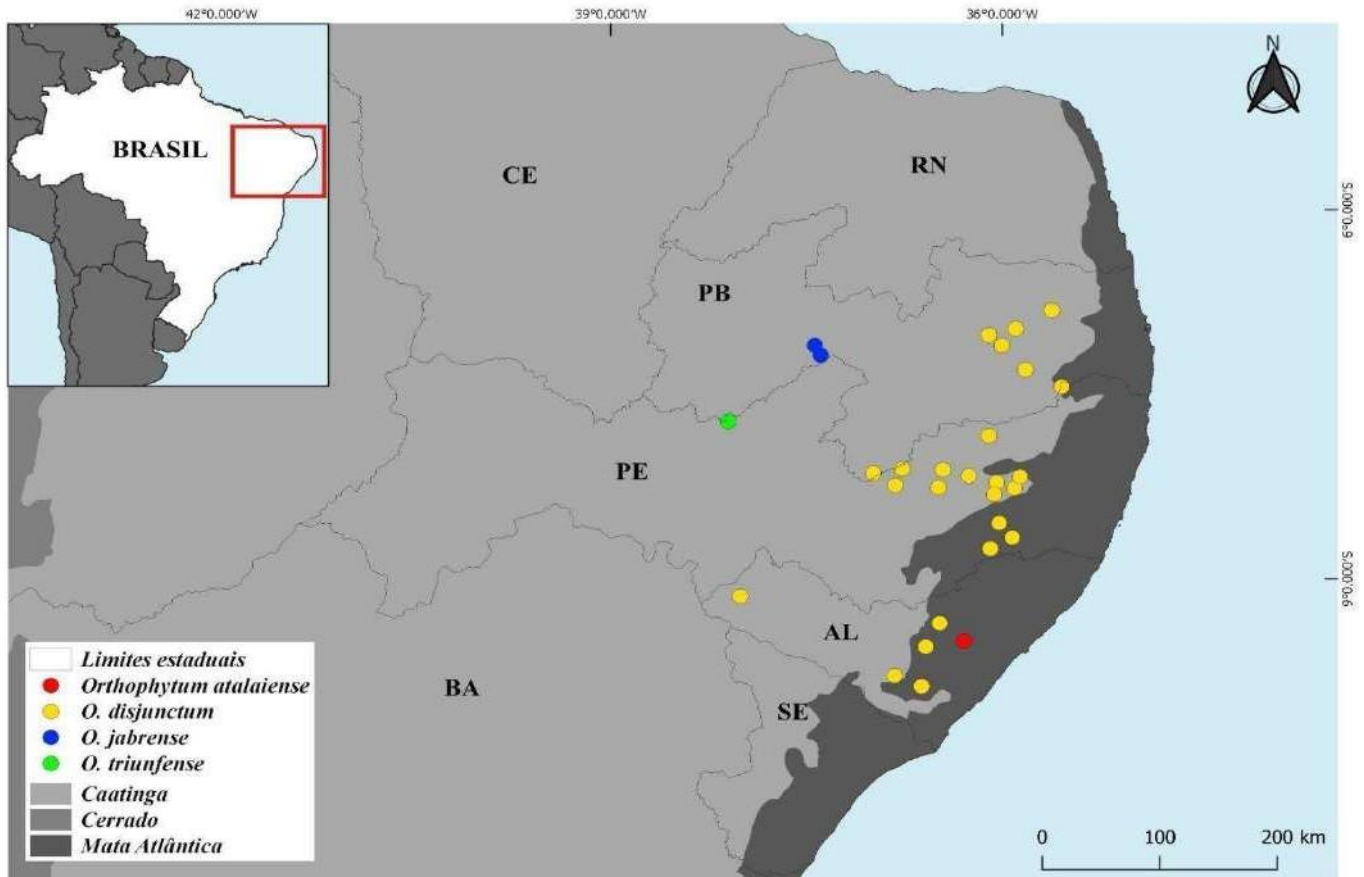
floração ocorre ao longo do ano com sobreposição do período de frutificação (Siqueira Filho; Leme, 2007). Ocorre na região Nordeste, nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba em afloramentos rochosos graníticos na Caatinga ou em áreas de Brejos de Altitude, associados ao Agreste (Figura 2) (Louzada, 2012).

*Orthophytum atalaiense* J.A.Siqueira & Leme (Figura 1A) é rupícola, curto caulescente, 47-65 cm de altura que também se propaga por brotações na base da roseta e no ápice da inflorescência, além de folhas com 12-17 cm compr. e bainhas distintas das lâminas foliares (Louzada, 2012). A espécie é considerada endêmica da Serra da Nacéia, na divisa dos municípios de Atalaia e Marimondo, no estado de Alagoas onde ocorre sobre afloramentos rochosos na Mata Atlântica (Figura 2) (Siqueira Filho & Leme, 2007). Está morfologicamente relacionada com *O. disjunctum*, no entanto se difere pela altura da planta durante a antese e por outras características importantes como a base das lâminas foliares, brácteas do pedúnculo e brácteas primárias (Louzada, 2012).

*Orthophytum jabrense* G.S.Baracho & J.A.Siqueira (Figura 1B) é igualmente rupícola como as anteriores, curto caulescente mas que propaga-se vegetativamente por estolões alongados de 10-15 cm de comprimento (Louzada, 2012). Está morfologicamente relacionada com *O. disjunctum* pelo seu aspecto vegetativo, diferenciando-se dela pelas lâminas arqueadas e mais longas, inflorescência curta e compacta, com flores reunidas em fascículos, brácteas do escapo ausentes e brácteas florais triangulares (Baracho & Siqueira-Filho, 2004). É conhecido apenas pela localidade tipo, no Parque Estadual do Pico do Jabre (Maturéia-PB) e por duas coleções no município de Tavares, ambos os municípios na Paraíba (Figura 2) (Louzada, 2012), em afloramentos em brejos de altitude no domínio da Caatinga (Baracho & Siqueira-Filho, 2004).

*Orthophytum triunfense* J.A.Siqueira & Leme (Figura 1D) é uma outra espécie rupícola que propaga-se por estolões alongados de 10-16 cm de comprimento (Louzada, 2012). Em relação a *O. disjunctum*, *O. triunfense* difere pelo porte menor com escapo floral mais curto e inflorescências proporcionalmente menores, pétalas mais longas e providas de apêndices crenulado-recortados (Siqueira-Filho & Leme, 2007). *O. triunfense* é conhecida unicamente de afloramentos rochosos, no município de Triunfo, um dos Brejos de Altitude mais isolados de Pernambuco, com localidade tipo no Pico do Papagaio (Figura 2), com floração, em geral, de

julho e agosto (Siqueira-Filho & Leme, 2007). Embora distintas, essas espécies são confundidas devido a morfologia e ocorrência em Brejos de Altitude (Louzada, 2012).



**Figura 2.** Distribuição geográfica das espécies do grupo “*Orthophytum disjunctum*” e classificação das áreas. Onde, os pontos vermelhos representam a distribuição geográfica de *Orthophytum atalaiense* J.A.Siqueira & Leme, os pontos amarelos representam a distribuição de *Orthophytum disjunctum* L.B. Sm, os pontos azuis representam *Orthophytum jabrense* G.S.Baracho & J.A.Siqueira e os pontos vermelhos

representam a distribuição de *Orthophytum triunfense* J.A.Siqueira & Leme baseada nos dados georreferenciados coletados para as espécies. **Fonte:** A autora (2023).

### 2.3. BREVE ABORDAGEM FILOGENÉTICA EM BROMELIACEAE

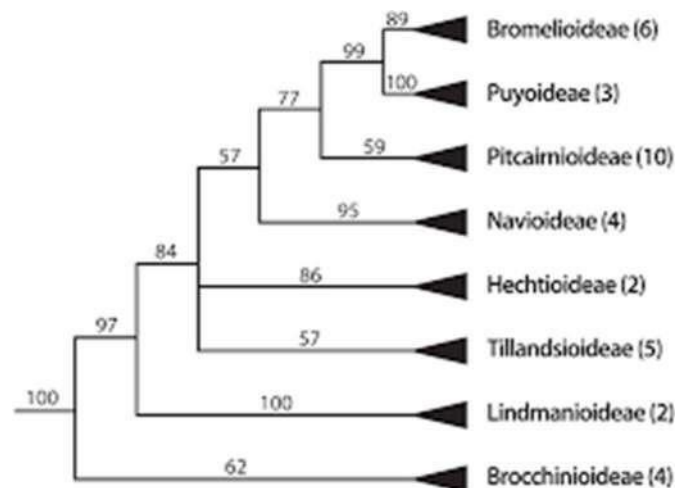
A filogenia estuda as relações evolutivas entre os organismos levando em consideração a ancestralidade comum das espécies. É um pressuposto que as espécies têm um ancestral comum e que o material genético é transmitido de ancestrais para descendentes ao longo dos ramos da árvore filogenética (Liu *et al.*, 2009). Henning (1950), inferiu o método filogenético, tendo por base o parentesco de diferentes táxons onde, tais linhagens só são aceitos como sendo naturais se estiverem reunidos em agrupamentos comprovadamente monofiléticos. As informações filogenéticas são codificadas do material genético de espécies de uma maneira que permite que informações como, as sequências de DNA, sejam usadas para rastrear a história evolutiva até o ancestral comum mais recente (Liu *et al.*, 2009).

Em grupos vegetais especificamente, várias abordagens têm sido utilizadas em estudos filogenéticos para melhor inferir as relações existentes (Givnish *et al.*, 2011; Krapp *et al.* 2014; Louzada *et. al.*, 2014; Palma-Silva *et al.*, 2016; Terry *et al.*, 1997). Bromeliaceae, constitui um dos clados morfológica e ecologicamente diversificados e ricos em espécies nos trópicos e subtropicais americanos (Givnish *et al.*, 2011). É considerada monofilética e altamente diversa dos demais representantes inseridos na ordem Poales (APG IV, 2016). Durante sua história evolutiva sofreu notável radiação adaptativa, incluindo a via fotossintética do metabolismo do ácido crassuláceo (CAM), suculência foliar, hábito de tanque e presença de tricomas altamente especializados (Benzing, 2000). Apesar da riqueza de espécies das bromélias, sua abundância em muitos habitats neotropicais e sua importância como plantas ornamentais, ainda faltam revisões taxonômicas atualizadas para a maioria dos gêneros, especialmente para os mais ricos em espécies (Silvestro *et al.*, 2014).

As bromélias têm sido foco de muitos estudos filogenéticos nas últimas décadas, estudos esses que lançaram luz sobre muitas questões sobre a história evolutiva do grupo, como por exemplo, para a investigação da radiação adaptativa (Palma Silva *et al.*, 2016). Como resultado de análises filogenéticas, oito subfamílias monofiléticas são reconhecidas em Bromeliaceae

(Givnish et al., 2007). Esta classificação é suportada, corroborada por outros estudos posteriores (Figura 3) (Givnish et al., 2011).

Das oito subfamílias, Bromelioideae é talvez ainda a menos compreendida pelas circunscrições genéricas imprecisas e por vezes, conflitantes para alguns gêneros, como ressaltado por Evans et al. (2015). Apresenta aproximadamente 936 espécies e 33 gêneros (Smith & Downs, 1979; Gouda et al., 2023, em constante atualização). É caracterizada pelo ovário ínfero e os frutos do tipo baga com sementes sem apêndices (Moreira *et al.*, 2006). É possível distinguir, com base nas hipóteses filogenéticas propostas, duas linhagens para a subfamília, sendo a primeira caracterizada por espécies com hábito de tanque que propiciam o acúmulo de água no centro das suas rosetas (fitotelmo) e a segunda sem essa característica (Schulte *et al.*, 2005; Schulte *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Filogenia proposta para Bromeliaceae na qual é possível observar as oito linhagens de subfamílias reconhecidas atualmente e os índices de suporte apresentados. Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae, Navioideae, Hechtioideae, Tillandsioideae, Lindmanioideae e Brocchionioideae. **Fonte:** Adaptado de Givnish *et al.*, (2011).

Schulte et al. (2005), apresentaram dados filogenéticos relacionados a Bromelioideae indicando que as primeiras linhagens do grupo tinham distribuição andina e eram plantas terrícolas com fotossíntese C3, sem fitotelmo de captação de água. Os autores indicam ainda o monofiletismo do grupo. A hipótese de monofiletismo foi confirmada posteriormente por Schulte et al. (2009), onde as relações filogenéticas de Bromelioideae foram inferidas usando dados de sequência de DNA, do gene nuclear de baixa cópia fosforibulocinase (PRK) e cinco

loci do genoma plastidial. No entanto, muitos agrupamentos como por exemplo, o clado *Hohenbergia Orthophytum*, que emergem nas filogenias moleculares, são difíceis de serem definidos e circunscritos com base na taxonomia tradicional atualmente compreendidas (Evans et al., 2015).

O gênero *Orthophytum* foi descrito por Beer (1954) considerando o material com inflorescência pedunculada coletada por Mez nomeado de *Orthophytum glabrum* (Louzada e Wanderley, 2010). Apesar das descrições apresentadas por Smith e Downs (1955 e 1979) ainda haviam lacunas presentes dentro das espécies do gênero. Os principais estudos evolutivos de *Orthophytum* dividiram o gênero em dois grupos informais com base na característica na inflorescência, sendo escaposa ou séssil (Louzada & Wanderley, 2010). Essa classificação foi proposta com base em estudos anteriores conduzidos por Leme (2004), que subdividiu o grupo em dois complexos, o primeiro contendo as plantas que apresentam inflorescência séssil e o segundo contendo as espécies com inflorescências pedunculadas, nos quais esses grupos também foram subdivididos em seis sub complexos (três para cada tipo de inflorescência). No entanto, essas descrições não se mantiveram até o momento atual, pesquisas subsequentes mostraram que o subcomplexo *Suphutii* por exemplo, deve ser considerado como um gênero específico, nomeado *Lapanthus* (Louzada & Versieux, 2010). E o subcomplexo *Amoenum* foi confirmado como monofilético e agora é reestabelecido como como *Sincorea* Ule (Louzada & Wanderley 2016).

Schulte et al. (2009) descreveram uma relação filogenética rasa entre *Orthophytum* e *Cryptanthus*, com *Cryptanthus glaziovii* Mez. Silvestro et al. (2014) considerou *Orthophytum* como um grupo polifilético, com espécies sendo encontradas em duas linhagens separadas. Todavia, o estudo de Louzada et al. (2014) apresentou uma filogenia molecular de 39 espécies do gênero *Orthophytum* que confirma o seu monofiletismo e apresenta várias linhagens altamente suportadas dentro do gênero, esclarecendo conseqüentemente, parte das relações infragenéricas do gênero.

#### 2.4. COALESCÊNCIA E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES

A necessidade crescente de compreender as distribuições, variabilidades que resultam no intervalo de espécies e a disponibilidade de dados apropriados estimularam uma série de estudos recentes (Gaston, 1996). Em um esforço para reduzir a subjetividade inerente na delimitação das espécies, e os diversos conceitos e interpretações adotadas, busca-se delimitar



tais entidades de maneira mais estável. Em comparação com caracteres morfológicos tradicionais, os dados genéticos têm uma clara vantagem na delimitação de espécies, especialmente as crípticas, que podem ser indistinguíveis morfológicamente (Zhang et al., 2011).

O uso de marcadores moleculares como ferramentas para delimitação de espécies aumentou drasticamente nas últimas décadas de maneira que, todos os três genomas de plantas (nuclear, mitocondrial e cloroplastidial) podem ser utilizados (Duminil & Di Michele, 2009). As amostras, geralmente de folhas, costumam ser preservadas em sílica gel e/ou mantidas congeladas até o isolamento do DNA de maneira que esse se mantenha íntegro e não seja portanto comprometida a qualidade das análises (Nybom et al., 2014).

Existem diversos questionamentos sobre a velocidade da especiação das plantas, embora os estudos da evolução impliquem que as barreiras reprodutivas podem surgir rapidamente (Rieseberg & Willis, 2007). Por isso, qualquer propriedade que forneça evidências de separação de linhagens é relevante para inferir os limites e o número de espécies (De Queiroz, 2007).

Dentre as abordagens empregadas nos estudos de delimitação de espécies, destacam-se as análises fundamentadas com base na Teoria de Coalescência proposta por Kingman (1982). A ideia central da teoria coalescente é que as linhagens amostradas podem ser concebidas como selecionando seus ancestrais à medida que retrocedemos no tempo, gerada em sua fusão gradual até que todas se unam em uma única linhagem, conhecida como o Ancestral Comum mais recente das amostras - MCRA, do inglês *Most Recent Common Ancestor* (Rosenberg & Nordborg, 2002).

O objetivo é, portanto, determinar se o clado se diversificou em grupos com evolução independente, ou seja, em espécies, e, caso afirmativo, delimitá-las (Fujisawa & Barraclough, 2013). O método coalescente pode ser considerado um modelo genético que incorpora os princípios da genética mendeliana e permite a análise de genealogias aleatórias (Rosenberg & Nordborg, 2002). A Teoria de Coalescência fornece uma estrutura controlada diferente e mais robusta para identificar objetivamente espécies crípticas e/ou alopátricas, por meio da análise de dados genéticos (Fujita et al., 2012).

A abordagem *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC), é um método estatístico utilizado para delimitar espécies que envolve sequências de DNA (Esselstyn et al., 2012). O método é capaz de estimar os limites das espécies diretamente relacionadas a partir das taxas



de ramificação em árvores filogenéticas de populações mistas, sem a necessidade de definição prévia de populações ou espécies (Vuataz et al., 2011). Tendo em vista que os limites de algumas espécies não podem ser estimados apenas com base em dados morfológicos. Essas análises geralmente envolvem a coleta de sequências de um único locus para uma amostra de organismos que possuem uma relação próxima (Esselstyn et al., 2012) Em resumo, o GMYC visa identificar uma transição nas árvores genéticas, que ocorre entre um processo de Yule, que governa os tempos de ramificação durante a especiação, e um processo coalescente, que governa os tempos de ramificação dentro das populações (Fujisawa & Barraclough 2013). A abordagem foi testada por Vuataz et al. (2011) em amostras de espécies do gênero *Rhithrogena* (Ephemeroptera) incluindo um marcador mtDNA padrão e um marcador nDNA. Para plantas, as aplicabilidades das abordagens GMYC foram aplicadas por autores como Oyebanji et al., (2020) avaliando o poder discriminatório de dois marcadores moleculares para 53 espécies abrangendo as duas famílias botânicas e por Ancona et al. (2022), realizando uma análise coalescente multiespecífica para delimitar as espécies de um complexo de *Tillandsia ionantha* (Bromeliaceae) composto anteriormente por oito espécies, contudo as análises revelaram inco cinco espécies crípticas e outras três linhagens independentes.

### 3. OBJETIVOS

Considerando a semelhança morfológica e de distribuição do grupo e a hipótese filogenética já apresentada para o gênero *Orthophytum*, o presente trabalho tem como objetivo reconstruir a filogenia e testar a delimitação de espécies no grupo “*Orthophytum disjunctum*” através de dados moleculares.

1. Testar o monofiletismo do grupo “*Orthophytum disjunctum*”
2. Recuperar as relações de parentesco entre as espécies do grupo.
3. Testar os limites entre as espécies do grupo “*Orthophytum disjunctum*” baseado em análises de coalescência.



# CAPÍTULO I

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BOTANICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY

**Estudos moleculares no grupo “*Orthophytum disjunctum*”: Um caso de microendemismo em uma porção do Nordeste do Brasil**

Maria Izabel Silva de Lima Paiva<sup>1,4</sup>, Clarisse Palma-Silva<sup>2</sup> & Rafael B. Louzada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil, lima.paiva@ufpe.br, <https://orcid.org/0000-0001-6564-290X>

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Recife, PE 50670-901, Brasil, cpalma@unicamp.br; <https://orcid.org/0000-0003-0192-5489>

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

<sup>4</sup>**Autor para correspondência:** Maria Izabel Silva de Lima Paiva. Telefone: +55 81995205853. E-mail: lima.paiva@ufpe.br

## RESUMO

As relações das espécies com seus ancestrais em comum juntamente com os limites existentes entre as entidades são alguns dos principais pontos de debate do pensamento biológico. Dado que a especiação nem sempre é acompanhada por mudanças morfológicas, os estudos que apresentam abordagens moleculares são capazes de auxiliar na compreensão de espécies consideradas problemáticas quanto a sua delimitação. O gênero *Orthophytum*, da família Bromeliaceae, subfamília Bromelioideae, é endêmico do Brasil, apresenta 54 espécies e ocorre em afloramentos rochosos, com dois principais centros de diversificação (Minas Gerais e Bahia). Sua atual hipótese filogenética postula que os clados se distribuem de maneira biogeográfica. O grupo “*Orthophytum disjunctum*” é aqui denominado da seguinte forma devido a sobreposição dos caracteres morfológicos e semelhança na distribuição e representado pelos táxons *O. disjunctum*, *O. jabrense*, *O. atalaiense* e *O. triumfense*. Aqui, propomos a reconstrução parcial da filogenia de *Orthophytum* e testamos a delimitação de espécies, com base na abordagem GMYC, no grupo “*Orthophytum disjunctum*” através de dados moleculares de marcadores plastidiais e nucleares. Os resultados recuperaram as relações de parentesco do grupo e corroboram estudos prévios que indicam o gênero como monofilético e que as relações recuperadas para o grupo se apresentam congruentes com a atual hipótese filogenética. Contudo, as relações intraespecíficas, dentro desses clados, não estão bem suportadas e os seus limites não puderam ser inferidos a partir da abordagem de coalescência .

**Palavras Chave:** Coalescência, Delimitação, Filogenia, Marcadores moleculares, *Orthophytum disjunctum*.

## INTRODUÇÃO

As espécies são consideradas unidades fundamentais na biologia, apesar da maioria dos biólogos estarem familiarizados com a diversidade de conceitos alternativos, sua definição pode ser considerada como foco de debate no pensamento biológico (Pinheiro *et al.*, 2018; De Queiroz, 2005). Por isso, De Queiroz (1998, 2007), propõe o conceito de linhagem geral das espécies e as define como linhagens que estão evoluindo separadamente através de processos de especiação. De acordo com Liu *et al.* (2009), as plantas oferecem boas oportunidades para testar hipóteses que possam melhor reproduzir tanto a ancestralidade quanto definir os limites que existem entre as espécies. Os estudos filogenéticos buscam descrever as relações evolutivas considerando a sua ancestralidade, supondo que as espécies tem um ancestral em comum e que o material genético desse ancestral é transmitido para os seus descendentes ao longo dos ramos das árvores conforme proposto por Liu *et al.* (2009). Essas informações podem, portanto, inferir a priori a melhor hipótese para a história evolutiva de um determinado grupo biológico e os taxa associados.

Considerando- se que existam incógnitas em relação a velocidade de especiação das plantas e o surgimento de suas barreiras reprodutivas, qualquer evidência que forneça dados relevantes para descrever os limites que existem entre as espécies é considerado importante para inferências posteriores (Rieseberg & Willis, 2007; De Queiroz, 2007). No sentido mais amplo, a delimitação de espécies é o ato de identificar e reconhecer claramente a diversidade biológica ao nível taxonômico hierárquico específico (Carstens *et al.*, 2013). E como a

especiação, nem sempre é acompanhada por alterações morfológicas perceptíveis, o uso dos dados moleculares surge como uma das possibilidades para a resolução de incertezas e inconsistências taxonômicas relacionadas às espécies que se apresentam pouco claras em relação à sua delimitação com base nas características morfológicas mais recorrentes (Bickford *et al.*, 2007).

Diversos métodos filogenéticos e não filogenéticos foram descritos e empregados largamente para a delimitação entre espécies (Sites & Marshall, 2003). Entre eles, é possível descrever os métodos baseados em árvores de genes. As análises de delimitação baseadas na teoria coalescente que foi proposta por Kingman (1982). Essa por sua vez, tem como objetivo determinar se um clado se diversificou em grupos com evolução separada ou não (Fujisawa & Barraclough, 2013). Este é um método estatístico capaz de delimitar espécies usando sequências de DNA (Esselstyn *et al.*, 2012). A abordagem baseada em topologias GMYC (Generalized Mixed Yule coalescent) visa identificar uma transição nas árvores genéticas que ocorrem no processo que governa os tempos de ramificação durante a especiação (Fujisawa & Barraclough, 2013).

Bromeliaceae é considerada um dos principais componentes florísticos da biota do Neotrópicos (Versieux, 2008), sendo dividida em oito subfamílias e reconhecidas morfológicamente (Givnish, 2007). Entre as subfamílias está Bromelioideae que apresenta aproximadamente 32 gêneros e 800 espécies (Luther, 2006) e distingue-se principalmente pelas espécies possuírem ovário ínfero e o fruto do tipo baga (Moreira *et al.*, 2006). Apesar do seu monofiletismo confirmado, algumas relações intergenéricas observadas em Bromelioideae são consideradas conflitantes entre determinados gêneros (Evans *et al.*, 2015).

O gênero *Orthophytum* Beer (1854), pertence a Bromelioideae, é endêmico do Brasil e ocorre caracteristicamente em afloramentos rochosos em áreas de Caatinga, Cerrado e Mata

Atlântica (Siqueira-Filho & Leme, 2007). É composto por aproximadamente 54 espécies (Louzada, 2020), e de acordo com Siqueira-Filho & Leme (2007), apresenta dois principais centros de diversificação - um na região Sudeste (Minas Gerais) e outro no Nordeste (Bahia). Uma série de estudos morfológicos realizados por Leme (2004), propõe a divisão do gênero em dois agrupamentos de espécies: o primeiro deles composto por plantas com inflorescências sésseis e o segundo com as plantas com inflorescências pedunculadas, dos quais esses grupos ainda são subdivididos em seis subgrupos por outros caracteres morfológicos adicionais. No entanto, os agrupamentos propostos por Leme (2004) não se sustentaram com as novas abordagens filogenéticas propostas por Louzada *et al.* (2014).

A atual hipótese filogenética apresentada por Louzada *et al.* (2014), indica que os grupos de *Orthophytum* tem uma diversificação que vai do Sul para o Norte do Brasil e que seus clados estão distribuídos biogeograficamente. Apesar da grande contribuição, nem todos os representantes do gênero foram amostrados no estudo e algumas de suas relações e limites infragenéricos não estão ainda bem esclarecidos, segundo os próprios autores do referido estudo. Entre os grupos que necessitam de maior e melhor entendimento, está aquele formado pelas espécies *Orthophytum disjunctum* L.B. Sm., *Orthophytum atalaiense* J.A.Siqueira & Leme, *Orthophytum jabrense* G.S.Baracho & J.A.Siqueira e *Orthophytum triunfense* J.A.Siqueira & Leme. Essas quatro espécies, são aqui denominadas de grupo “*Orthophytum disjunctum*”, pela forte sobreposição de caracteres morfológicos, dificuldade de reconhecimento das espécies através da macromorfologia e a similaridade na distribuição geográfica. O grupo se distribui nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, basicamente na região do Planalto da Borborema, porém apenas *Orthophytum disjunctum* ocorre em todos os estados citados, divergindo das outras espécies, que ocorrem apenas em suas respectivas localidades tipo.



Dessa forma um estudo mais abrangente é necessário para que essas relações sejam mais bem esclarecidas. Sendo assim, nesse estudo propomos a reconstrução parcial da filogenia de *Orthophytum*, buscando testar a delimitação dos táxons pertencentes ao agrupamento aqui denominado de “*Orthophytum disjunctum*”, através de dados moleculares de marcadores plastidiais e nucleares. Desta maneira, os objetivos aqui propostos são (1) testar o monofiletismo do grupo “*Orthophytum disjunctum*”; (2) recuperar as relações de parentesco entre os táxons inseridos no grupo “*Orthophytum disjunctum*”, e (3) testar os limites entre as espécies do grupo “*Orthophytum disjunctum*” baseado em análises de coalescência

## MATERIAIS E MÉTODOS

### AMOSTRAGEM DOS DADOS

Foram realizadas expedições de coleta nos estados do Rio Grande do Norte, Alagoas, Paraíba e Pernambuco com o objetivo de mostrar da melhor forma possível a distribuição geográfica para as populações conhecidas para as espécies. Foram coletadas amostras de folhas, preservadas ainda em campo em sílica granulada, de aproximadamente 10 espécimes de cada população, totalizando dez populações visitadas (sete populações de *Orthophytum disjunctum*, uma de *Orthophytum atalaiense*, uma de *Orthophytum jabrense* e uma de *Orthophytum triunfense*). Vale também salientar que os vouchers dessas populações estão depositados no Herbário Geraldo Mariz (UFP), da Universidade Federal de Pernambuco, como indicado na Tabela 1.

### RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA NO GRUPO

Para recuperar as relações filogenéticas e testar o monofiletismo do alvo estudado foram utilizados um conjunto de dados de 54 espécies (vide Tabela 2), contendo além das espécies do

grupo em estudo, "*Orthophytum disjunctum*", também aquelas apresentadas por Louzada *et al.* (2014), onde foram amostradas espécies dos seguintes gêneros da subfamília Bromelioideae: *Orthophytum* (39 spp.) *Bromelia* (2 spp.), *Ochagavia* (1 sp.) , *Cryptanthus* (8 spp.) e da subfamília monogenérica Puyoideae (1 sp.), buscando assim reproduzir a melhor hipótese possível.

### COALESCÊNCIA

Para as análises de delimitação de espécies foram utilizados um total de 10 indivíduos distribuídos em sete populações (quatro populações de *Orthophytum disjunctum*, uma de *Orthophytum atalaiense*, uma de *Orthophytum jabrense* e uma de *Orthophytum triunfense*), conforme indicado na Tabela 3.

### EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

O DNA genômico total foi extraído do material foliar usando um procedimento baseado no protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1995), e a sua qualidade analisada em gel de agarose 1% corado com GelRed. As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystem Corp., Foster City, Califórnia). Para as regiões nucleares às amplificações ocorreram primeiramente para a região nuclear AGT1 (AGT1\_SP6 5'-ATTAGGTGACACTATAGATTGATGTCGCA TTAACCGGC-3' e AGT1\_M13 5'-AACAGC TATGACCATGGCAGTTCTTCAGTCCCCATG-3) de acordo com o descrito por Silvestro *et al.* (2014) com desnaturação inicial 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos com 95°C por 30 segundos de desnaturação, anelamento a 59°C por 30 segundos e extensão a 70°C por 2 minutos, o último prolongado em 10 segundos/ciclo após 15 ciclos. Por sua vez, para o gene do fitocromo C (*PHYC*) foi amplificado utilizando os primers phyc515f-br AAG CCC TTY TAC GCT ATC CTG CAC CG e phyc1699r-br ATW GCA TCC ATT TCA ACA TCT TCC CA.

Primers internos foram utilizados para sequenciamento (phyc974f-br GCT CCT CAC GGC TGC CAC GCT CA e phyc1145r-mo CCT GMA RCA RGA ACT CAC AAG CAT ATC) baseado no programa padrão apresentado por Louzada et al. (2014): 2 min de desnaturação inicial em 95 °C seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, 30 s anelamento a 59°C, e extensão de 2 min a 70°C e uma etapa de extensão final a 70°C por 7 min. As regiões *trnL-trnF* e *trnH-psbA* foram amplificadas usando primers universais descritos em Shaw et al. (2005), Sang et al. (1997), respectivamente. As regiões plastidiais foram amplificadas com reações de 20 µL utilizando o GoTaq® Master Mixes (código de referência: M 7123). Usando um programa baseado em Palma-silva *et al.* (2009): 3 min de desnaturação inicial a 95 °C seguido por 38 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, 30 s de anelamento a 53 °C e 30 s min de extensão a 72 °C e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram limpos utilizando um protocolo baseado no uso de isopropanol. O sequenciamento do ciclo foi realizado com o kit Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystem Corp., Foster City, Califórnia) com uma desnaturação inicial de 60 s a 95 °C, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 s, 10 s recozimento a 50 °C e 2 min de extensão a 60 °C. As sequências foram geradas em um sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer.

#### ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA E CONGRUÊNCIA DE DADOS

As sequências foram montadas e editadas utilizando o UGene. O concatenamento e alinhamento foi realizado no MEGA 11, usando a função MUSCLE e seguindo os parâmetros do sistema, seguido por ajustes manuais quando necessário. A congruência entre as partições dos dois marcadores plastidiais (*trnL-trnF* e *trnH-psbA*) e versus o marcador nuclear (PHYC) foram avaliadas visualmente.

#### ANÁLISE FILOGENÉTICA

Inferimos uma análise de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood) gerando uma árvore filogenética no MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021) usando 1000 réplicas no *bootstrap*. O pacote de software BEAST 1.8 (Drummond & Rambaut, 2007) foi usado para realizar uma análise Bayesiana com base nos conjuntos de dados de plastídeos e dos dados nucleares. O modelo mais adequado (GTR + G + I) para o conjunto de dados foi implementado usando o critério de informação de Akaike (Akaike, 1973) implementado no JModeltest. Além disso, foi escolhido um modelo de relógio relaxado com taxas não correlacionadas seguindo uma distribuição log-normal. A árvore foi definida para o processo de Yule. Quatro cadeias de Markov simultâneas Monte Carlo (MCMC) foram realizadas para 20.000.000 gerações amostradas a cada 1.000 gerações. Os valores de verossimilhança foram monitorados graficamente no Tracer 1.6 (Rambaut *et al.*, 2013). Por fim, o modelo mais congruente foi selecionado e os resultados foram observados no FigTree v1. 4.4.

## ANÁLISE DE COALESCÊNCIA

Foram analisados os dados de sequências gerados de 20 indivíduos distribuídos em 7 populações do grupo microendêmico *Orthophytum disjunctum* para duas regiões plastidiais (*trnL-trnF* e *trnH-psbA*) e uma nuclear (AGT1). Em seguida, foram geradas árvores ultramétricas no software BEAST 1.8. o teste de coalescência na delimitação, delimitação de espécies utilizando o GMYC (Fujisawa e Barraclough, 2013) foi implementado também no Software R (<https://www.r-project.org/>) usando o pacote P2C2M.GMYC.

## RESULTADOS

### FILOGENIA

O conjunto final de dados concatenados compreendeu 2.571 caracteres de comprimento dos quais 430 foram considerados como variáveis, de maneira que, o alinhamento final de dados

compreende 562 posições para *trnH-psbA*, 877 posições para *trnL-trnF* e 1.158 posições para PHYC. As árvores de consenso filogenético baseadas em regiões plastidiais versus a baseada em região nuclear não se mostraram incongruentes quanto às suas topologias amostradas.

De acordo com o conjunto de dados aqui apresentado, o modelo estatístico de máxima verossimilhança, expressa uma melhor topologia em relação à inferência bayesiana, com suporte considerado moderado na maioria dos cladogramas (Figura 1). O clado amostrado para o grupo “*Orthophytum disjunctum*” se apresenta como monofilético e com um alto suporte estatístico (BS: 100), contudo as suas relações infragenéricas entre *Orthophytum disjunctum*, *Orthophytum atalaiense*, *Orthophytum jabrense* e *Orthophytum triunfense* não estão bem suportadas na topologia observada. O grupo “*Orthophytum disjunctum*” emerge como grupo irmão das espécies que ocorrem nos estados de Minas Gerais e da Bahia. *O. disjunctum* é a primeira a derivar do clado e é a espécie do grupo que apresenta distribuição geográfica mais ampla no Planalto da Borborema. Os dois táxons do grupo que apresentam maior relação são *O. atalaiense* e *O. triunfense* que tem distribuição documentada bem mais restrita, mas ainda sim relacionada (Figura 1).

O clado amostrado para *Sincoraea* que mesmo sendo um gênero distinto, não aparece bem suportado (BS: 76) nas análises desenvolvidas aqui, enquanto *Cryptanthus* e *Lapanthus* aparecem como distintos e bem suportados quanto às suas relações intragenéricas (BS: 97 e 97 respectivamente).

Já as relações recuperadas para *Orthophytum* mostra que parte dos grandes cladogramas observados entre as espécies na presente análise, são expressos com um alto suporte. Isso pode ser exemplificado pelo clado composto por *O. gramogolense*, *O. diamantinense*, *O. mello-barreto* e *O. schulzianum* (BS: 97) que compreende o clado Mello-barreto citada por Louzada

*et al.* (2014), enquanto que o clado composto por *O. foliosum*, *O. vagans*, *O. pseudovagans* e *O. zanonii*, nomeado de Vagans, por Louzada *et al.* (2014), não é expresso na topologia como bem suportado (BS: 69).

## COALESCÊNCIA

A análise de GMYC usando a abordagem de limite único, recuperou três espécies dentro do grupo de espécies, sendo o tempo limite de transição das espécies sugere que ocorreu a aproximadamente 500 mil anos (Figura 2). Tais resultados não fornecem suporte para uma decisão assertiva quanto aos limites das entidades, pois as relações entre os indivíduos amostrados não se mostram completamente congruentes. Os resultados aqui obtidos inferem que os ramos vermelhos formam dois principais clados, um contendo os indivíduos das espécies *O. disjunctum* e *O. atalaiense*. E um outro clado em que os indivíduos *O. jabrense* e *O. triunfense* aparecem com ramos em preto, indicando portanto, que possivelmente estas podem não se tratar de uma espécie isolada das outras (Figura 3).

## DISCUSSÃO

### FILOGENIA

A combinação de dados moleculares baseadas nas regiões que são tradicionalmente utilizadas pra Bromelioideae, como *trnH-psbA*, *trnL-trnF* e PHYC (Leme *et al.*, 2007; Louzada *et al.*, 2014; Palma-Silva *et al.*, 2009; Sass & Specht, 2010) em parte das espécies que utilizamos nas análises aqui apresentadas, não se expressa com a mesma topologia obtida por Louzada *et al.* (2014). Tais divergências parciais, no entanto, podem ser discutidas a partir dos distintos modelos estatísticos utilizados. Os resultados apresentados por Louzada *et al.* (2014) estão em um conjunto de análises baseadas em Máxima Parcimônia e Análises Bayesianas, enquanto os dados aqui recuperados estão apresentados após o uso do modelo estatístico de máxima

verossimilhança. Esse tipo de método geralmente pode ser considerado mais robusto que outras técnicas (Kolaczknowski & Thornton, 2004), assim como evidenciado em Leme *et al.* (2017) que inferiram a filogenia do “complexo Cryptontoid”, baseados em análises de máxima verossimilhança e de inferência bayesiana. Os métodos aqui empregados não resolvem por completo as relações entre os clados, assim como os métodos utilizados nas bibliografias anteriores, também não esclarecem por completo as relações encontradas entre as espécies do gênero.

Após reconstrução das relações filogenéticas do grupo “*Orthophytum disjunctum*” é possível observar que o clado se apresentou como monofilético (Figura 1) corroborando a hipótese filogenética apresentada por Louzada *et al.* (2014). Além disso, monofiletismo do grupo é bem sustentado, de maneira que os valores de suporte do clado em que o grupo se insere é basicamente o mesmo do que o apresentado na hipótese filogenética mais atualizada. Quanto a relação entre as espécies do grupo representadas por: *Orthophytum disjunctum* L.B. Sm., *Orthophytum atalaiense* J.A.Siqueira & Leme, *Orthophytum jabrense* G.S.Baracho & J.A.Siqueira e *Orthophytum triunfense* J.A.Siqueira & Leme, essas continuam sem emergirem bem suportadas, repetindo a performance observada pelos autores anteriores (Louzada *et al.*, 2014).

O grupo foco do estudo se insere juntamente com a maioria das espécies que ocupam o clado Saxicola, indicado por Louzada *et al.* (2014) e estão distribuídas na porção mais ao norte do país. Apesar de estarem inseridas dentro do clado, aqui não há resultados consistentes que corroborem a hipótese biogeográfica de que todos os clados se organizam do Sul ao Norte do Brasil, já que o grupo de estudo ocorre exclusivamente ao norte do Rio São Francisco, divergindo das demais espécies amostradas que estão distribuídas mais ao Sul. Considerando que o clado apresenta espécies variabilidade nos tipos de inflorescência diferentes (espigas e

espigas de espigas. segundo a terminologia adotada por Louzada *et al.*, 2014), as espécies pertencentes ao clado saxicola possuem identificação por vezes desafiadora.

O grupo “*Orthophytum disjunctum*” é considerado também como endêmico da porção nordeste do país, ao norte do Rio São Francisco. *Orthophytum disjunctum* é o primeiro a divergir do clado e é o que apresenta a distribuição geográfica mais ampla. Esta região representa o Planalto da Borborema, que está dentro do Centro de Endemismo Pernambuco, que apresentam três zonas de vegetação que estão relacionadas ao padrão de distribuição das espécies (MMA, 2006). Tal região é influenciada fortemente por diferenças climáticas e pela influência de ventos úmidos (De Corrêa *et al.*, 2010). As bromélias por sua vez, são um grupo que apresenta espécies endêmicas e com distribuição restrita a certas porções ao Norte do Rio São Francisco e algumas dessas tem ocorrência restrita aos *inselbergs* (MMA, 2006). As espécies *Orthophytum triumfense* e *Orthophytum atalaiense* estão distribuídas nessas regiões e restritas aos *inselbergs* (Siqueira Filho & Leme, 2006). A vegetação das áreas de ocorrência das espécies obedece aos gradientes de zoneamento e ambas possuem morfologia semelhante por suas lâminas duro-coriáceas e inflorescências igualmente estruturadas (Siqueira Filho & Leme, 2006), além de outras características bastante variáveis e ainda não tão bem definidas na literatura, o que justificaria a sua relação na topologia apresentada.

A origem múltipla e independente de características semelhantes dentro de linhagens intimamente relacionadas é um dos pontos importantes na taxonomia, pois torna difícil o reconhecimento das relações filogenéticas entre essas linhagens (Schulte *et al.*, 2009). Barfuss *et al.* (2016) por sua vez, postularam que as proposições sistemáticas na família Bromeliaceae devem estar baseadas em relações filogenéticas naturais e ter características morfológicas previsíveis. Isso, porém, não se reflete integralmente para as espécies foco do estudo. Esse tipo de discussão é comum de ser observada em Bromelioideae, já que esta é considerada uma



subfamília que apresenta algumas linhagens em que suas relações que ainda não estão bem descritas e esclarecidas (Evans et al., 2015).

Assim como entre outras espécies do gênero e gêneros afins, as relações entre as espécies do grupo “*Orthophytum disjunctum*” ainda não estão bem esclarecidas (Cruz et al., 2017; Evans et al., 2015; Silvestro et al., 2014). Isso se exemplifica em espécies que apresentam sobreposição em alguns caracteres morfológicos, como é o caso de *O. atalaiense* que está morfológicamente relacionada com *O. disjunctum* pelo seu aspecto vegetativo, diferenciando-se dela pelas lâminas arqueadas e mais longas, inflorescência curta e compacta, com flores reunidas em fascículos, as brácteas do escapo ausentes e as brácteas florais triangulares (Baracho & Siqueira-Filho, 2004). A reconstrução filogenética de Schulte & Zizka (2008) indica que os grupos de gêneros com distribuição geográfica semelhante (e possivelmente origem) podem estar mais relacionados. Por isso, essas relações precisam ser melhor descritas através de estudos mais específicos e abordagens mais refinadas e integrativas sendo, sempre que possível testados diversas vezes, para que assim seja possível entender melhor como se apresentam essas linhagens e as inconsistências nos resultados detectados.

Ainda que não seja o foco do nosso objeto de estudo, é possível citar outras relações expressas por nossa topologia, como por exemplo, os clados que apresentam as inflorescências do tipo sésil não estão suportadas para todas as linhagens. Os resultados informativos apresentados por Louzada et al. (2014), se assemelham aos nossos e mostram que espécies de *Cryptanthus* e *Lapanthus* estão bem suportadas quanto às relações de suas linhagens que apresentam inflorescência sésil, reforçando que novas análises como as aqui apresentadas podem corroborar estudos prévios, além de reforçar o arranjo sistemático natural dos táxons como postulado por Barfuss et al. (2016). Outro destaque a ser pontuado é o caso do gênero *Sincoraea* que também aparece como um clado distinto, e igualmente não tão bem suportado,

semelhante ao que foi publicado na hipótese mais atualizada disponível para o táxon (Louzada *et al.*, 2014).

## COALESCÊNCIA

Nossos resultados destoam em relação a topologia observada e conforme observado por Fujita & Leaché (2011) por vezes não é possível identificar um padrão e determinar qual a real situação quanto às entidades biológicas já que muitas espécies não exibem diferenças morfológicas claras ou diferenças fixas de DNA em múltiplos loci.

Essa discordância nos resultados e a escassez existente no conjunto de dados mostra que, o uso de alguns modelos simplificados para a delimitação pode gerar conflitos, principalmente para métodos que dependem de árvores bem resolvidas (Burrie-Carranza *et al.*, 2023). Existem outros modelos estatísticos que podem ser utilizados juntamente à abordagem coalescente visando testar hipóteses que compreendem dados de espécies que têm distribuição restrita e descrição conflitante. O BPP é um software objetivo dadas as suposições claras do modelo, podendo ser considerado um salto gigante em direção a delimitação objetiva de espécies, sendo por tanto, recomendado como ferramenta (Fujita & Leaché, 2011).

Existem literaturas que retratam que o uso do método de coalescência sozinho pode não delimitar espécies e sim estruturas, contudo ainda é fato que este é inovador e não deve ser descartado, mas sim acompanhado, em determinados casos, de outras fontes de dados, sendo esses dados morfológicos ou até ecológicos (Sukuraman & Knowles, 2017). Por essa razão, os sistemas com populações pequenas e isoladas devem receber especial atenção nas análises e interpretações propostas (Burrie-Carranza *et al.*, 2023), pois nem sempre será possível compreender esses limites apenas com um único tipo de dado. Fujita & Leaché (2011) reforçam que precisamos evitar uma inflação taxonômica e explorar melhor os resultados, pois estudos

assim podem fornecer uma comparabilidade clara, prática e filosoficamente fundamentada entre as espécies.

## CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados, evidenciam que as relações e métodos de análise empregados para o grupo “*Orthophytum disjunctum*”, tem a necessidade de estudos mais específicos que possam esclarecer melhor as suas relações tendo em vista que os modelos estatísticos aqui testados não mostraram a melhor resposta, mas mostram potencial de estudo para o grupo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida. Ao laboratório de Morfo-Taxonomia e Evolução Vegetal (MTV). Ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Prospecção e Gestão da Biodiversidade do Nordeste (NPGBio) da UFPE e ao Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genômica de Plantas (LEEG) da Unicamp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Ancona, J. J., Pinzón-Esquível, J. P., Ruiz-Sánchez, E., Palma-Silva, C., Ortiz-Díaz, J. J., Tun-Garrido, J., ... & Raigoza, N. E.** 2022. Multilocus Data Analysis Reveal the Diversity of Cryptic Species in the *Tillandsia ionantha* (Bromeliaceae: Tillandsioideae) Complex. *Plants*, **11(13): 1706.**

**Akaike, H.** 1973. Maximum likelihood identification of Gaussian autoregressive moving average models. *Biometrika*, **60(2): 255-265.**

**Barfuss, M. H., Till, W., Leme, E. M., Pinzón, J. P., Manzanares, J. M., Halbritter, H., ... & Brown, G. K. 2016.** Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa*, **279(1): 1-97.**

**Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., ... & Das, I. 2007.** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, **22(3): 148-155.**

**Burriel-Carranza, B., Estarellas, M., Riano, G., Talavera, A., Tejero-Cicuendez, H., Els, J., & Carranza, S. 2022.** Species boundaries to the limit: validating species delimitation methods is critical to avoid taxonomic inflation in the genomic era. *bioRxiv*, **2022-12.**

**BRASIL.** Ministério do Meio Ambiente. 2006. *Diversidade biológica e conservação da floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco.*

**Cruz, G. A., Zizka, G., Silvestro, D., Leme, E. M., Schulte, K., & Benko-Iseppon, A. M. 2017.** Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr.(Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **107, 152-165.**

**Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. 2013.** How to fail at species delimitation. *Molecular ecology*, **22(17):4369-4383.**

**De Barros Corrêa, A. C., Tavares, B. D. A. C., de Araújo Monteiro, K., & de Souza Cavalcanti, L. C. 2010.** Megamorfologia e morfoestrutura do Planalto de Borborema. *Revista do Instituto Geológico (Descontinuada)*, **31(1-2): 35-52.**

**De Queiroz, K. 1998.** The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. *Endless forms: species and speciation.*

**De Queiroz, K. 2005.** Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102, 6600-6607.**

**De Queiroz, K. 2007.** Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, **56(6): 879-886.**

**Drummond, A. J., & Rambaut, A.** 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, **7(1): 1-8.**

**Esselstyn, J. A., Evans, B. J., Sedlock, J. L., Anwarali Khan, F. A., & Heaney, L. R.** 2012. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **279(1743): 3678-3686.**

**Evans, T. M., Jabaily, R. S., de Faria, A. P. G., de Sousa, L. D. O. F., Wendt, T., & Brown, G. K.** 2015. Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany*, **40(1): 116-128.**

**Fujisawa, T., & Barraclough, T. G.** 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, **62(5): 707-724.**

**Fujita, M. K., & Leaché, A. D.** (2011). A coalescent perspective on delimiting and naming species: a reply to Bauer et al. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **278(1705): 493-495.**

**Givnish, T. J., Millam, K. C., Berry, P. E., & Sytsma, K. J.** 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, **23(1): 3-26.**

**Leme, E. M. C.** 2004. Studies on *Orthophytum*, an endemic genus of Brazil—Part I. *Journal of the Bromeliad Society*, **54(1): 36-43.**

**Liu, L., Yu, L., Pearl, D. K., & Edwards, S. V.** 2009) Estimating species phylogenies using coalescence times among sequences. *Systematic biology*, **58(5): 468-477.**

**Louzada, R. B., Schulte, K., Maria das Graças, L. W., Silvestro, D., Zizka, G., Barfuss, M. H., & Palma-Silva, C.** 2014. Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **77: 54-64.**

Louzada, Rafael B. *Orthophytum* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Accessed in: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6274>>.

**Luther, H.** 2006. An alphabetical list of bromeliad binomials 10th edition. *Sarasota, FL, Bromeliad Society International.*

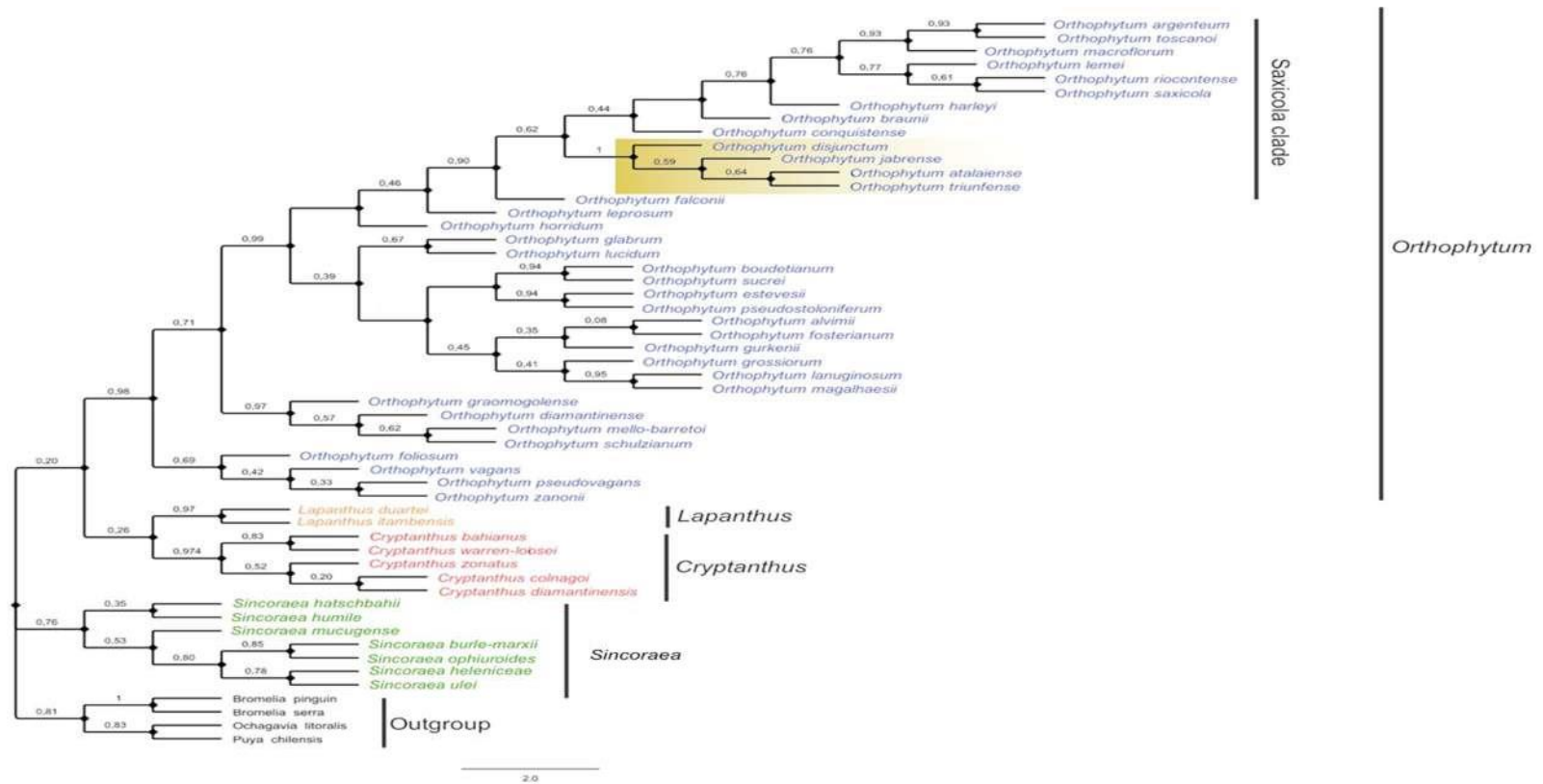
**Moreira, B. A., Wanderley, M. D. G. L., & Barros, M. A. V. C.** 2006. Bromélias: Importância ecológica e diversidade, taxonomia e morfologia. *Instituto de Botânica–IBt. São Paulo.*

**Sukumaran, J., & Knowles, L. L.** 2017. Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114(7): 1607-1612**

## ANEXOS

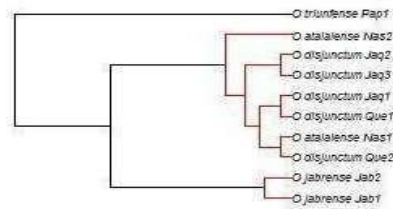
## FIGURAS

**Figura 1.** Árvore da Análise de Máxima Verossimilhança baseada em dados nucleares e plastidiais (trnH-psbA, trnL-trnF e PHYC), onde os números acima dos ramos são os valores de bootstrap (BS) e o clado marcado em laranja representa o grupo “*Orthophytum disjunctum*”.

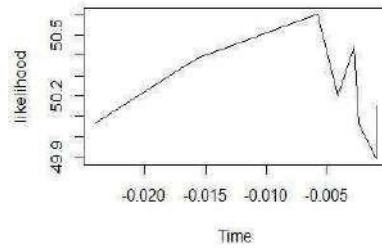
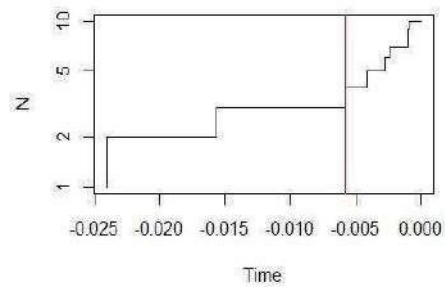


**Figura 2.** A- Resultado da análise de delimitação de espécies utilizando o modelo de limiar único GMYC (baseado em nDNA). Uma árvore ultramétrica obtida no BEAST com agrupamentos individuais destacados em vermelho. B - Gráfico de linhagem ao longo do tempo com base na árvore calibrada de tempo obtida de todos os 10 espécimes. O aumento acentuado na taxa de ramificação, correspondente à transição de eventos de ramificação interespécies para intraespécies, é indicado pela linha vermelha. Fonte: A autora (2023)

**A**

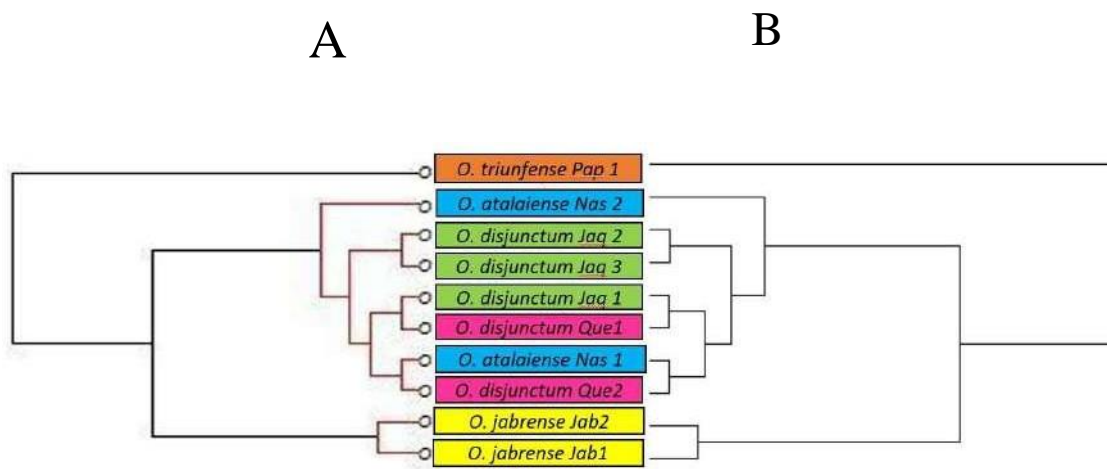


**B**





**Figura 3.** Comparação entre as diferentes abordagens. A. resultados derivados da análise GMYC (mostrados em vermelho) B. Resultados da análise do BEAST. Fonte: A autora (2023).



## TABELAS

**Tabela 1.** Espécies do grupo “*Orthophytum disjunctum*” coletadas para o estudo, onde táxon representa as espécies alvo, seguido por localidade representando as populações coletadas, estado que representa os estados onde foram coletadas, seguido por longitude e latitude que corresponde as coordenadas geográficas e por fim o voucher associado e o herbário onde encontra-se depositado. Fonte: A autora (2023).

Táxon	Localidade	Estado	Longitude	Latitude	Voucher
<i>O. disjunctum</i>	Pedra de Santo Antônio	Paraíba	-35.79793302	-7.343988691	Paiva et al. 28 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Pedra do Touro	Paraíba	-35.90391283	-7.352191821	Paiva et al. 26 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Serra do Urubu - Jaqueira	Pernambuco	-35.845556	-8.733333	Paiva et al. 43 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Serra de São Bento	Rio Grande do Norte	-35.6994063	-6.416668306	Paiva et al. 36 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Pedra do Navio - Puxinanã	Paraíba	-35.98139298	-7.129917921	Paiva et al. 30 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Município - Puxinanã	Paraíba	-35.96467519	-7.147791523	Paiva et al. 31 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Parque ecológico de Serra Negra - Bezerras	Pernambuco	-35.75611816	-8.151703507	Paiva et al. 29 (UFP)
<i>O. atalaiense</i>	Serra da Nascéia - Divisa de Marimondo e Atalaia	Alagoas	-36.194972	-9.591083	Paiva et al. 40 (UFP)
<i>O. jabrense</i>	Pico do Jabre - Maturéia	Paraíba	-37.35139847	-7.266940117	Paiva et al. 37 (UFP)
<i>O. triunfense</i>	Pico do Papagaio - Triunfo	Pernambuco	-38.05599633	-7.819889079	Paiva et al. 42 (UFP)

**Tabela 2.** Tabela de vouchers das amostras utilizadas no estudo, adaptada de Louzada *et al.* (2014). B - Herbário do Jardim Botânico de Berlin; FR - Herbário Senckenbergianum; HB- Herbário Bradeanum; K - Herbário do Jardim Botânico Real, Kew; MBML - Herbário do Museu de Biologia Melo Leitão; SP - Herbário do Instituto de Botânica, São Paulo; WU - Herbário da Universidade de Viena; UFP - Herbário Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco. Adaptado de: Louzada et al., 2014.

Táxon	Voucher	Genbank Access		
		<i>trnH-psbA</i>	<i>trnL-trnF</i>	PHYC
<i>Bromelia pinguin</i> L.	Schulte 300508-10 (FR)	KJ676896	JX649511	JX649422
<i>Bromelia serra</i> Griseb.	Horres 029 (FR)	KJ676897	DQ084622	JX649423
<i>Cryptanthus bahianus</i> L.B. Sm.	Gartenherbar 11060a (B)	KJ676898	KJ676905	DQ084634
<i>Cryptanthus colnagoi</i> Rauh & Leme	HBV 7103 (WU)	KJ676899	KJ676906	JX649432
<i>Cryptanthus diamantinense</i> Leme	Leme 3813 (HB)	KJ676900	KJ676907	JX649433
<i>Cryptanthus warren-loosei</i> Leme	0013741 (WU)	KJ676902	KJ676911	JX649436
<i>Cryptanthus zonatus</i> (Vis.) Beer	IBT living collection	KJ676903	KJ676912	KJ716288
<i>Lapanthus duartei</i> (L.B. Sm.) Louzada & Versieux	Louzada et al. 28 (SP)	KJ666540	KJ676913	KJ716289
<i>Lapanthus itambensis</i> (Versieux & Leme) Louzada & Versieux	Louzada et al. 30 (SP)	KJ666541	KJ676914	KJ716290
<i>Ochagavia litoralis</i> (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner	Horres 015a (FR)	KJ676904	KJ676955	KJ716329
<i>Orthophytum albivii</i> W. Weber	Louzada et al. 90 (SP)	KJ666542	KJ676915	KJ716291
<i>Orthophytum argentum</i> Louzada & Wand	Louzada et al. 110 (SP)	KJ666544	KJ676917	KJ716293
<i>Orthophytum boudetianum</i> Leme & L. Kollmann	Louzada 135 (SP)	KJ666546	KJ676918	KJ716295
<i>Orthophytum braunii</i> Leme	Machado 50 (SP)	KJ666547	KJ676919	KJ716296
<i>Sincoraea burle-marxi</i> L.B. Sm. & Read	Louzada & Moreira 45 (SP)	KJ666548	KJ676920	KJ716297
<i>Orthophytum conquistense</i> Leme & M. Machado	Machado 277 (SP)	KJ666549	KJ676921	KJ716298
<i>Orthophytum estevesii</i> (Rauh) Leme	Fontana et al. 2959 (MBML)	KJ666550	KJ676923	KJ716299
<i>Orthophytum falconii</i> Leme	Reis & Falcon s.n. (HB 89876)	KJ666551	KJ676924	KJ716300
<i>Orthophytum foliosum</i> L.B. Sm.	Louzada et al. 13 (SP)	KJ666552	KJ676925	KJ716301
<i>Orthophytum fosterianum</i> L.B. Sm.	Louzada et al. 17 (SP)	KJ666553	KJ676926	KJ716302
<i>Orthophytum glabrum</i> (Mez) Mez	Louzada & Medeiros 139 (SP)	KJ666554	KJ676927	KJ716303
<i>Orthophytum graomogolense</i> Leme & C.C. Paula	Louzada & Moreira 42 (SP)	KJ666555	KJ676928	KJ716304
<i>Cryptanthus colnagoi</i> Rauh & Leme	HBV 7103 (WU)	KJ676899	KJ676906	JX649432
<i>Orthophytum grossiorum</i> Leme & C.C. Paula	Leme et al. 5584 (HB)	KJ666556	KJ676929	KJ716305
<i>Orthophytum gurkenii</i> Hutchison	Louzada 133 (SP)	KJ666557	KJ676930	KJ716306
<i>Orthophytum harleyi</i> Leme & M. Machado	Louzada et al. 108 (SP)	KJ666558	KJ676931	KJ716307
<i>Sincoraea hatschbachii</i> Leme	Louzada et al. 104 (SP)	KJ666559	KJ676932	KJ716308
<i>Sincoraea heleniceae</i> Leme	Wanderley et al. 2544 (SP)	KJ666560	KJ676933	KJ716309
<i>Orthophytum horridum</i> Leme	Louzada & Medeiros 138 (SP)	KJ666561	KJ676934	KJ716310
<i>Sincoraea humile</i> L.B. Sm.	Louzada & Moreira 41 (SP)	KJ666562	KJ676935	KJ716311
<i>Orthophytum lanuginosum</i> Leme & C.C. Paula	Louzada & Medeiros 143 (SP)	KJ666563	KJ676936	KJ716312
<i>Orthophytum lemei</i> E. Pereira & I.A. Penna	Louzada et al. 186	KJ666564	KJ676937	KJ716313
<i>Orthophytum leprosum</i> (Mez) Mez	Louzada & Medeiros 141 (SP)	KJ666545	KJ676938	KJ716294
<i>Orthophytum lucidum</i> Leme & H. Luther	Louzada & Medeiros 142 (SP)	KJ666565	KJ676939	KJ716314
<i>Orthophytum macroflorum</i> Leme & M. Machado	Machado s.n. (SP 441733)	KJ666566	KJ676940	KJ716315
<i>Orthophytum magalhaesii</i> L.B. Sm.	Louzada 131 (SP)	KJ666567	KJ676941	KJ716316
<i>Orthophytum mello-barretoii</i> L.B. Sm.	Louzada & Medeiros 84 (SP)	KJ666568	KJ676942	KJ716317
<i>Sincoraea mucugense</i> Wand. & Conc	Louzada & Moreira 58 (SP)	KJ666569	KJ676943	KJ716318
<i>Sincoraea ophiuroides</i> Louzada & Wand.	Louzada & Wanderley 88 (SP)	KJ666570	KJ676944	KJ722611
<i>Orthophytum pseudostoloniferum</i> Leme & L. Kollmann	Leme et al. 6915 (MBML)	KJ666571	KJ676945	KJ722610
<i>Orthophytum pseudovagans</i> Leme & L. Kollmann	Demuner et al. 3464 (MBML)	KJ666572	KJ676946	KJ716319
<i>Orthophytum riocontense</i> Leme	Machado 1206 (SP)	KJ666573	KJ676947	KJ716320
<i>Orthophytum saxicola</i> (Ule) L.B. Sm.	Louzada et al. 122 (SP)	KJ666574	KJ676948	KJ716321
<i>Orthophytum schulzianum</i> Leme & M. Machado	Machado 1218 (SP)	KJ666576	KJ676949	KJ716323
<i>Orthophytum sucrei</i> H. Luther	Louzada 136 (SP)	KJ666577	KJ676950	KJ716324
<i>Orthophytum toscanoii</i> Leme	Machado 1213 (SP)	KJ666578	KJ676951	KJ716325
<i>Sincoraea ulei</i> Louzada & Wand.	Louzada & Wanderley 91 (SP)	KJ666579	KJ676952	KJ716326
<i>Orthophytum vagans</i> M.B. Foster	Louzada s.n. (SP 442925)	KJ666580	KJ676953	KJ716327
<i>Orthophytum zannonii</i> Leme	Louzada et al. 18 (SP)	KJ666581	KJ676954	KJ716328
<i>Puya chilensis</i> Molina	Chase 23824 (K)	KJ666582	KJ676956	KJ716330
<i>Orthophytum atalaiense</i> J.A. Siqueira & Leme	Paiva et al. 40 (UFP)			
<i>Orthophytum jabrense</i> G.S. Baracho & J.A. Siqueira	Paiva et al. 37 (UFP)			
<i>Orthophytum disjunctum</i> L.B. Sm.	Paiva et al. 43 (UFP)			
<i>Orthophytum triumfense</i> J.A. Siqueira & Leme	Paiva et al. 42 (UFP)			

**Tabela 3.** Tabela dos pontos de coleta utilizados para as análises de coalescência, onde táxon representa as entidades amostradas no estudo, seguido por localidade onde as populações foram amostradas, os estados onde se encontram essas populações e por fim, latitude e a longitude, representando as coordenadas geográficas. Os respectivos vouchers estão indicados previamente na Tabela 1.

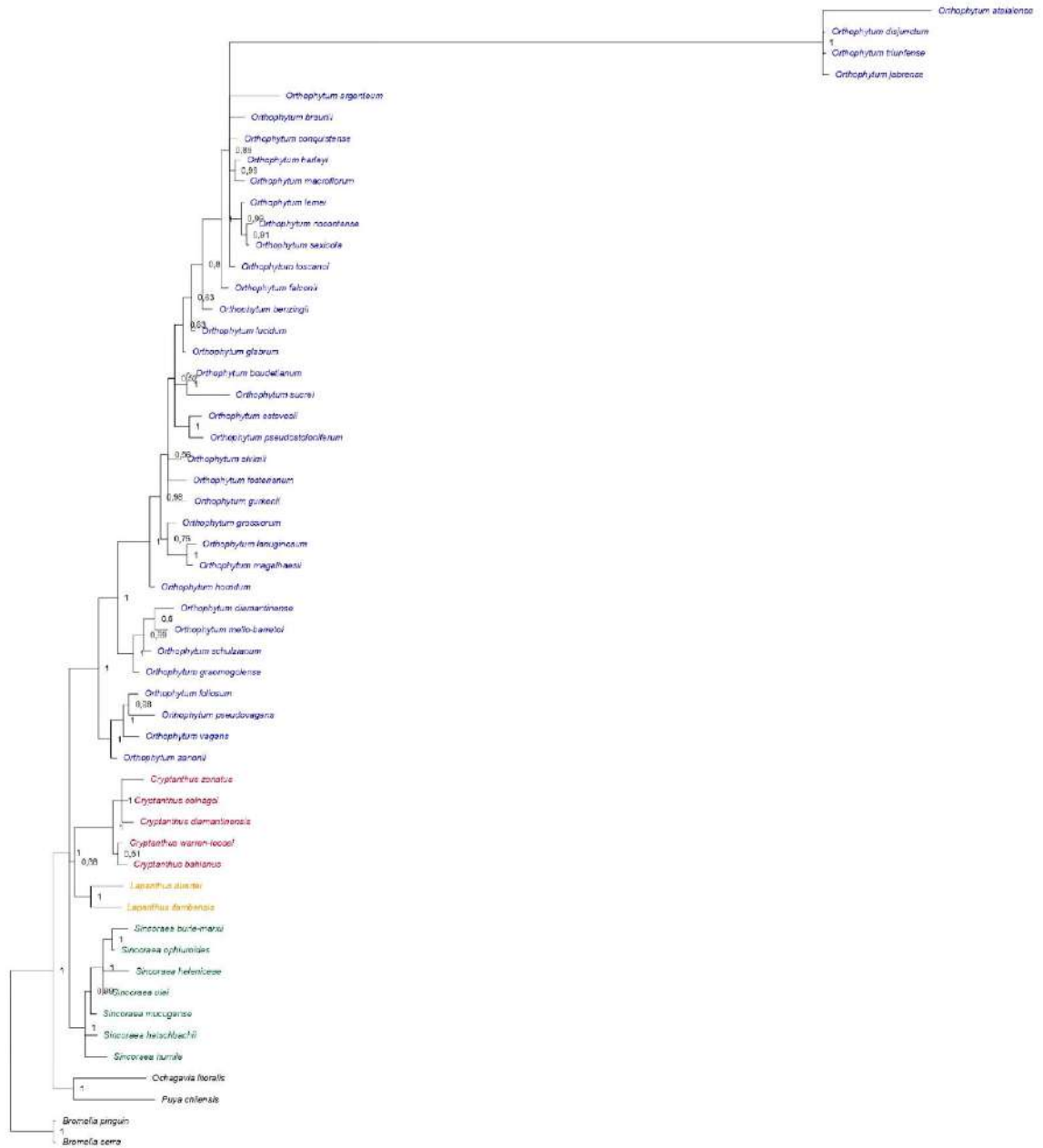
Táxon	Localidade	Estado	Longitude	Latitude	Voucher
<i>O. disjunctum</i>	Pedra do Touro	Paraíba	-35.90391283	-7.352191821	Paiva et al. 26 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Serra do Urubu - Jaqueira	Pernambuco	-35.845556	-8.733333	Paiva et al. 43 (UFP)
<i>O. disjunctum</i>	Serra de São Bento	Rio Grande do Norte	-35.6994063	-6.416668306	Paiva et al. 36 (UFP)
<i>O. atalaiense</i>	Serra da Nascéia - Divisa de Marimbondo e Atalaia	Alagoas	-36.194972	-9.591083	Paiva et al. 40 (UFP)
<i>O. jabrense</i>	Pico do Jabre - Maturéia	Paraíba	-37.35139847	-7.266940117	Paiva et al. 37 (UFP)
<i>O. triunfense</i>	Pico do Papagaio - Triunfo	Pernambuco	-38.05599633	-7.819889079	Paiva et al. 42 (UFP)

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Figura 4.** Resultado da análise Bayesiana de maneira que as principais relações estão amostradas para os principais clados. Espécies em verde representam *Sincoraea*, espécies em laranja representam *Lapanthus*, espécies em vermelho representam o gênero *Cryptanthus* seguido pelas espécies em azul que representam gênero *Orthophytum*. Fonte: A autora (2023)



**Figura 5.** Árvore Filogenética obtida através de análise no software CIPRES usando o MrBayes, onde as espécies em preto são consideradas o outgroup, as espécies em azul são representadas pelo gênero *Orthophytum*, as espécies em laranja são representadas por *Laphantus* e as em vermelho representadas como gênero *Crypthantus*.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Esse estudo evidenciou que o grupo "*Orthophytum disjunctum*" pode ser considerado como monofilético.
- O grupo diverge das espécies que tem origem na Bahia e apesar do seu alto suporte, as suas relações não corroboram com a hipótese filogenética mais atualizada para o gênero.
- Suas relações estão possivelmente relacionadas ao zoneamento geográfico das áreas de ocorrência do grupo
- As relações observadas para os táxons analisados e métodos de análise empregados para o grupo "*Orthophytum disjunctum*", reforçam mais uma vez a necessidade de estudos mais específicos e direcionados às espécies pertencentes a estes gêneros com relações evolutivas ainda pouco esclarecidas.
- Com base nas nossas descobertas, é recomendado que sejam realizados outros estudos, com novos modelos estatísticos e um número amostral maior para as espécies pertencentes ao gênero.
- A abordagem Coalescente não se mostrou efetiva para a delimitação das espécies amostradas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angiosperm Phylogeny Group (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, p. 1-20, 2016.

Ancona, Juan J. et al. Multilocus Data Analysis Reveal the Diversity of Cryptic Species in the *Tillandsia ionantha* (Bromeliaceae: Tillandsioidae) Complex. *Plants*, v. 11, n. 13, p. 1706, 2022.

Baracho, G. S.; Siqueira-Filho, J. A. A new species of *Orthophytum* from Northeastern Brazil. *Vidalia*, v. 2, n. 1, p. 46-51, 2004.

Benzing, DH. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press.

Brown, G.K. & Gilmartin, A.J. Chromosomes of the Bromeliaceae. *Selbyana*, v. 9, p. 88-93, 1986.

Cascante-Marín, A., Trejos, C., Madrigal, R., & Fuchs, E. J. Genetic diversity and reproductive biology of the dioecious and epiphytic bromeliad *Aechmea mariae-reginae* (Bromeliaceae) in Costa Rica: implications for its conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 192, n. 4, p. 773-786, 2020.

Dayrat, Benoit. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 85, n. 3, p. 407-417, 2005.

De Queiroz, Kevin. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. suppl 1, p. 6600-6607, 2005.

De-Queiroz K. (2007) Species concepts and species delimitation. *Syst Biol* 56:879–886

Esselstyn, J. A., Evans, B. J., Sedlock, J. L., Anwarali Khan, F. A., & Heaney, L. R. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 279, n. 1743, p. 3678-3686, 2012.



Evans, T. M., Jabaily, R. S., de Faria, A. P. G., de Sousa, L. D. O. F., Wendt, T., & Brown, G. K. Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany*, v. 40, n. 1, p. 116-128, 2015.

Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., & Moritz, C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 27, n. 9, p. 480-488, 2012.

Fujisawa, Tomochika; Barraclough, Timothy G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, v. 62, n. 5, p. 707-724, 2013.

Gaston, Kevin J. Species-range-size distributions: patterns, mechanisms and implications. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 11, n. 5, p. 197-201, 1996.

Givnish T J, Millam KC, Berry PE, Sytsma KJ. 2007. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23: 3-26.

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Riina BVER, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith AC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical

Gouda EJ, Butcher D. A list of accepted Bromeliaceae names. [<http://bromeliad.nl/bromNames/>]. Jardim Botânico Universitário, Utrecht

Henning, W. Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik. Deutscher Zentralverlag, 1950.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. Artmed Editora, 2009.

Kingman, John Frank Charles. The coalescent. *Stochastic processes and their applications*, v. 13, n. 3, p. 235-248, 1982.

Knowles, L. Lacey; Carstens, Bryan C. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, v. 56, n. 6, p. 887-895, 2007.

Krapp, F., de Barros Pinangé, D. S., Benko-Iseppon, A. M., Leme, E. M., & Weising, K. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematics and Evolution*, v. 300, p. 1591-1614, 2014.

Leme, E.M.C. Studies on *Orthophytum*, an endemic genus of Brazil – Part I. *Journal of the Bromeliad Society*, v. 54, p. 36-43, 2004.

Leme, E.M.C.; Heller, S.; Zizka, G.; Halbritter, H. New circumscriptions of *Cryptanthus* and new *Cryptanthoid* genera and subgenera (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular phylogeny. *Phytotaxa*, v. 318, p. 1–88, 2017.

Liu, L., Yu, L., Pearl, D. K., & Edwards, S. V. Estimating species phylogenies using coalescence times among sequences. *Systematic Biology*, v. 58, n. 5, p. 468-477, 2009.

Louzada, Rafael B.; *Orthophytum* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6274>>. Acesso em: 10 dez. 2021.

Louzada, Rafael B.; Versieux, Leonardo M. *Lapanthus* (Bromeliaceae, Bromelioideae): a new genus from the southern Espinhaço Range, Brazil. *Systematic Botany*, v. 35, n. 3, p. 497-503, 2010.

Louzada, R. B., Schulte, K., Maria das Graças, L. W., Silvestro, D., Zizka, G., Barfuss, M. H., & Palma-Silva, C. Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 77, p. 54-64, 2014.

Louzada, Rafael B.; Wanderley, M. das GL. Revision of *Orthophytum* (Bromeliaceae): the species with sessile inflorescences. *Phytotaxa*, v. 13, n. 1, p. 1-26, 2010.

Mayr, Ernst. The biological species concept. In: *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. Columbia University Press, New York, p. 17-29, 2000.

Moreira, Bianca Alsina; Wanderley, Maria das Graças Lapa; Barros, M. A. V. C. Bromélias: Importância ecológica e diversidade, taxonomia e morfologia. Instituto de Botânica–IBt. São Paulo, 2006.

Nybom, Hilde; Weising, Kurt; Rotter, Björn. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investigative Genetics*, v. 5, n. 1, p. 1-35, 2014.

Nordborg, Magnus. Coalescent theory. In: *Handbook of Statistical Genomics: Two Volume Set*, p. 145-30, 2019.

Oyebanji, O. O., Chukwuma, E. C., Bolarinwa, K. A., Adejobi, O. I., Adeyemi, S. B., & Ayoola, A. O. Re-evaluation of the phylogenetic relationships and species delimitation of two closely related families (Lamiaceae and Verbenaceae) using two DNA barcode markers. *Journal of Biosciences*, v. 45, p. 1-15, 2020.

Padial JM, Miralles A, Riva I, Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *frontiers in Zoology*, 7 (1), 1–14.

Palma-Silva, C., Leal, B. S., Chaves, C. J., & Fay, M. F. Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 181, n. 3, p. 305-322, 2016.

Pessoa, E. M., Alves, M., Alves-Araújo, A., Palma-Silva, C., & Pinheiro, F. Integrating different tools to disentangle species complexes: a case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon*, v. 61, n. 4, p. 721-734, 2012.

Pinangé, D. S., Louzada, R. B., Wöhrmann, T., Krapp, F., Weising, K., Zizka, G., ... & Benko-Iseppon, A. M. Population genetics shed light on species delimitation and life history of the *Dyckia pernambucana* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 192, n. 4, p. 706-725, 2019.

Pinheiro F, Dantas-Queiroz MV, Palma-Silva C. Plant species complexes as models to understand speciation and evolution: a review of South American studies. 2018. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 37, n. 1, p. 54-80.

Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *science*, v. 317, n. 5840, p. 910-914.

Rosenberg, Noah A.; Nordborg, Magnus. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 5, p. 380-390, 2002.

Schulte Katharina; Horres, Ralf; Zizka Georg. Filogenia molecular de Bromelioideae e suas implicações na biogeografia e na evolução do CAM na família. *Senckenbergiana Biologica*, v. 85, p. 1-13, 2005.

Schulte, Katharina; Barfuss, Michael HJ; Zizka, Georg. A filogenia de Bromelioideae (Bromeliaceae) inferida a partir de loci de DNA nuclear e plastídeo revela a evolução do hábito de tanque dentro da subfamília. *Filogenética Molecular e Evolução*, v. 51, n. 2, p. 327-339, 2009.

Silvestro, Daniele; Zizka, Georg; Schulte, Katharina. Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution*, v. 68, n. 1, p. 163-175, 2014.

Simpson, George Gaylord. The species concept. *Evolution*, v. 5, n. 4, p. 285-298, 1951.

Siqueira-Filho, J.A. & Leme, E.M.C. Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: Biodiversidade, conservação e suas bromélias. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial Ltda., 2007. 416 p.

Siqueira Filho, José Alves de. Fenologia da floração, ecologia da polinização e conservação de Bromeliaceae na Floresta Atlântica Nordestina. 2003. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

Sites Jr, Jack W.; Marshall, Jonathon C. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 18, n. 9, p. 462-470, 2003.

Smith LB. 1955. The Bromeliaceae of Brazil. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 26: 1-290

Smith, L.B.; Downs, R.J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropical Monograph*. Hafner Press, New York, v. 14, p. 1-660, 1974.

Smith LB, Downs RJ. 1979. Flora Neotropica, Monograph, Part 3, Bromelioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica. Organization for Flora Neotropica, Hafner, New York, p. 1493-2142.

Smith, Lyman B.; Till, W. Bromeliaceae. Springer, Berlin Heidelberg, 1998.

Tagliati, Marcela Cezar; De Oliveira, H. C.; De Faria, A. P. G. Fenologia reprodutiva, recursos florais e polinização de espécies de Bromeliaceae em um remanescente urbano de Floresta Atlântica do sudeste brasileiro. *Diversidade e Gestão*, v. 2, n. 2, p. 139-150, 2018.

Terry, Randall G.; Brown, Gregory K.; Olmstead, Richard G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany*, v. 84, n. 5, p. 664-670, 1997.

Versieux, Leonardo M .; Leme, Elton MC. Um novo Orthophytum litofítico (Bromeliaceae) da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, v. 17, n. 1, p. 130-134, 2007.

Versieux, Leonardo M. Checklist and one new species of Bromeliaceae from Pico do Itambé, Minas Gerais, Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 158, n. 4, p. 709-715, 2008.

Vuataz, L., Sartori, M., Wagner, A., & Monaghan, M. T. Toward a DNA taxonomy of Alpine Rhithrogena (Ephemeroptera: Heptageniidae) using a mixed Yule-coalescent analysis of mitochondrial and nuclear DNA. *PLoS One*, v. 6, n. 5, p. e19728, 2011.

Wanderley, M.G.L.; Martins, S.E. Bromeliaceae. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, v. 5, p. 39-162, 2007.

Wiens JJ. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic biology*, v. 56, n. 6, p. 875-878.

Zhang, C., Zhang, D. X., Zhu, T., & Yang, Z. Evaluation of a Bayesian coalescent method of species delimitation. *Systematic Biology*, v. 60, n. 6, p. 747-761, 2011.

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

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

## Instructions for Authors

---

### Article types

**Cover letter is mandatory for all articles types.**

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

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

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

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

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

[https://academic.oup.com/botlinnean/pages/General\\_Instructions](https://academic.oup.com/botlinnean/pages/General_Instructions)

## Author Guidelines

### Introduction

---

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

### Submission

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

### Peer review process

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

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

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