

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM
STIGMATODON (TILLANDSIOIDEAE, BROMELIACEAE)**



VITOR DA CUNHA MANHÃES

2021



**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM *STIGMATODON*
(TILLANDSIOIDEAE, BROMELIACEAE)**

VITOR DA CUNHA MANHÃES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica).

Orientador: Dra. Andrea Ferreira da Costa

Coorientação: Dr. Fabiano Salgueiro

Rio de Janeiro, RJ

2021

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM *STIGMATODON*
(TILLANDSIOIDEAE, BROMELIACEAE)**

Vitor da Cunha Manhães

Orientadores: Dra. Andrea Ferreira da Costa & Dr. Fabiano Salgueiro

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica).

Aprovada por:

Presidente, Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Rio de Janeiro, RJ

2021

Especialmente para meus pais *José Cleber e Luzia*,
para meus irmãos e sobrinhas dedico...

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, através do Museu Nacional do Rio de Janeiro, pela infraestrutura oferecida;

À minha querida orientadora Dra. Andrea Ferreira da Costa, por me receber com muito carinho, pelos eternos ensinamentos, conselhos, oportunidades e pela valiosa amizade. Muito Obrigado!

Ao meu coorientador Dr. Fabiano Salgueiro, pela disponibilidade e por acreditar nesta empreitada, pelos grandes ensinamentos, e pelo grande suporte laboratorial fornecido durante toda a fase de execução desta tese;

Ao Dr. Wellington Ronildo Clarindo e pela sua equipe do Laboratório de Pesquisa em Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa pela colaboração, sem o qual o trabalho de citometria e citogenética não seria possível;

À Universidade Federal de Viçosa por disponibilizar a infraestrutura necessária para o desenvolvimento das análises de citometria e citogenética;

Ao Dr. Fábio Demolinari de Miranda, pelos ensinamentos, e grande suporte de material laboratorial e didático, em diversas etapas de desenvolvimento desta tese;

A Capes pela concessão da bolsa de auxílio, sem a qual não seria possível a realização deste projeto;

Ao ICMBio, INEA e SMAC pelas autorizações de coleta nas Unidades de Conservação.

Aos meus amigos do laboratório de Sistemática de Bromeliaceae: Igor, Beatriz, Suara e Christian pela amizade, conversa e ideias, e especialmente ao Fernando (Capitão), pela grande amizade, companhia, ensinamentos, e que sempre esteve disposto em ajudar nos trabalhos de campo e auxiliar nas coletas de material botânico.

Ao grande amigo Dayvid Rodrigues Couto, pela parceria, grande incentivo, conselhos, sugestões, pelas divertidas coletas de material botânico, por conduzir minha primeira conversa com minha orientadora, e por todo suporte no início de minha estadia na cidade do Rio de Janeiro.

Aos demais amigos do programa de pós-graduação em Botânica do Museu Nacional, especialmente a Renatinha Gabrielli P. Santos pelas boas conversas, e Arthur Rodrigues pela grande amizade, conversas, e pelo auxílio nos trabalhos de campo.

A todos os professores da pós-graduação, pelo todo o conhecimento transmitido e que contribuíram fortemente para minha formação no doutorado, em especial: Dr. Marcelo Trovó L. de Oliveira, Dra. Cássia M. Sakuragui, Dra. Rosana C. Lopes, Dr. Ruy José V. Alves, Dra. Heloísa A.L. Carvalho, Dra. Nívea Dias dos Santos, Dra. Dra. Luci de Senna Valle, Dra. Tânia Wendt.

A prof. Dra. Jaqueline Gusmão da Silva da Universidade Estadual do Rio de Janeiro por aceitar ser minha revisora durante todo o desenvolvimento desta tese, contribuindo fortemente para o aprimoramento deste estudo;

A Dra. Tatiana Tavares Carrijo da Universidade Federal do Espírito Santo, por toda confiança empregada, pelo todo incentivo e pelas belas sugestões no desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários do herbário do Museu Nacional (R), técnicos e curadores, e em especial ao Nilber Gonçalves da Silva pela grande ajuda, suporte, e valiosos conselhos;

Aos funcionários do Museu Nacional – UFRJ, aos membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), especialmente à garagem e aos motoristas Israel e Mauro por todo o suporte fornecido.

Ao Henrique e Niva Vimercati por todo o suporte dado na cidade do Rio de Janeiro e por me hospedar em sua residência antes mesmo do início do doutorado, ainda no processo de seleção, e também pelas diversas caronas para o Espírito Santo.

Aos amigos do Rio de Janeiro: Cláudio, Amanda e Eduardo do antigo hostel pelos bons momentos e boas risadas. E também Marcel e Dona Édina pelo acolhimento no hostel Quintal do Maracanã;

Ao amigo e irmão Roberto Rezende pela confiança, pelas boas conversas, boas risadas, por toda receptividade, e pelo acolhimento em sua residência durante um longo período, e também a sua irmã Débora pela confiança e acolhimento. Sempre serei grato a vocês!

Aos meus tios Penha e Odenir, e minha prima Mariana, por toda assistência, carinho e motivação;

Em especial aos meus pais José Cleber e Luzia, meus irmãos Creusa e Cleber, minhas sobrinhas Sophia e Giulia, meu cunhado Carlos, e para minha melhor amiga Raika, por toda paciência, carinho, amor, compreensão, cuidados, conselhos, motivação, otimismo e por todo o suporte durante todo esse período.

A todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desta tese, e que conviveram comigo, meus sinceros e profundos agradecimentos, pela convivência e carinho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

Resumo	xii
Abstract	xiv
Estrutura da tese.....	1
Introdução Geral	3
Hipóteses.....	16
Referências	17
Capítulo 1 Transferability of nuclear microsatellite markers to <i>Stigmatodon</i> species: a bromeliad genus endemic to vertical cliffs of inselbergs in Brazil	35
Abstract.....	36
1.1 Introduction.....	36
1.2 Materials and Methods.....	38
1.2.1 <i>Species under study and sampling</i>	38
1.2.2 <i>DNA extraction and amplification</i>	38
1.2.3 <i>Data analysis</i>	38
1.3 Results and Discussion.....	40
1.4 References.....	42
Capítulo 2 Evidências morfológicas e genéticas no complexo <i>Stigmatodon goniorachis</i> (Tillandsioideae, Bromeliaceae) revelam uma nova espécie dos inselbergs da Floresta Atlântica	44
Resumo.....	45
2.1 Introdução.....	46
2.2 Material e Métodos.....	49
2.2.1 <i>Identificação das áreas de ocorrência das espécies do complexo <i>Stigmatodon goniorachis</i></i>	49
2.2.2 <i>Populações amostradas</i>	52
2.2.3 <i>Análises morfométricas</i>	55
2.2.4 <i>Diversidade e estrutura genética populacional</i>	57
2.2.4.1 <i>Amostras, extração de DNA e Microsatélites</i>	57
2.2.4.2 <i>Análise de Dados</i>	57

2.2.5 Tratamento taxonômico.....	59
2.2.6 Avaliação do grau de ameaça de extinção.....	59
2.3 Resultados.....	60
2.3.1 Análises morfológicas.....	60
2.3.1.1 Complexo <i>Stigmatodon goniorachis</i>	60
2.3.1.2 Populações de <i>Stigmatodon goniorachis</i>	62
2.3.2 Análises moleculares.....	65
2.3.3 Implicações taxonômicas.....	73
2.4 Discussão.....	77
2.5 Sinopse taxonômica e descrição da espécie nova.....	90
2.5.1 <i>Stigmatodon</i> Leme, G.K.Br. & Barfuss.....	90
2.5.2 Descrição do complexo <i>Stigmatodon goniorachis</i>	91
2.5.3 Chave de identificação das espécies do complexo <i>Stigmatodon goniorachis</i>	92
2.5.3.1 <i>Stigmatodon brassicoides</i>	93
2.5.3.2 <i>Stigmatodon costae</i>	94
2.5.3.3 <i>Stigmatodon francae</i>	95
2.5.3.4 <i>Stigmatodon goniorachis</i>	96
2.5.3.5 <i>Stigmatodon carioca</i> sp. nov.....	98
2.6 Referências.....	102
Capítulo 3. Is there a variation in the content of nuclear DNA and number of chromosomes of species occurring in isolated inselbergs? A case study of the genus <i>Stigmatodon</i> (Tillandsioideae, Bromeliaceae)	121
Abstract.....	122
3.1 Introduction.....	123
3.2 Material and methods	125
3.2.1 Study species.....	125
3.2.2 Flow cytometry analysis - FCM.....	129
3.2.3 Cytogenetic analysis.....	129
3.3 Results.....	130
3.3.1 Flow cytometry analysis - FCM.....	130
3.3.2 Cytogenetic analysis.....	130
3.5 Discussion.....	133

3.6 Conclusion.....	136
3.7 References.....	137
Considerações Finais	145
Material suplementar	147
Material suplementar 1.1.....	147
Material suplementar 1.2.....	148
Material suplementar 2.....	149
Material suplementar 3.....	150

RESUMO

DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM *STIGMATODON* (TILLANDSIOIDEAE, BROMELIACEAE)

Vitor da Cunha Manhães

Orientadores: Dra. Andrea Ferreira da Costa & Dr. Fabiano Salgueiro

Esta tese investiga a diversidade no complexo *Stigmatodon goniorachis*, endêmico dos *inselbergs* da Floresta Atlântica do estado do Rio de Janeiro, por meio do estudo das espécies e de suas populações a respeito de sua variação morfológica, diversidade genética, da quantidade de DNA nuclear e do número de cromossomos. Para as análises morfológicas foram coletadas amostras de folhas e flores de cinco indivíduos em cada uma das sete populações escolhidas, totalizando 35 indivíduos onde foram utilizadas 20 variáveis quantitativas e sete qualitativas nas análises de agrupamento e ordenação. A análise de agrupamento revelou a evidente separação das quatro espécies (*S. brassicoides*, *S. costae*, *S. goniorachis* e *S. francae*). Além disso, nas populações de *S. goniorachis* houve a formação de dois grupos distintos. A análise de PCA revelou que os principais componentes de variação foram o diâmetro do pedúnculo, o comprimento da bráctea floral e o comprimento do receptáculo. Nas populações de *S. goniorachis* os principais componentes de variação foram o comprimento da bráctea floral, largura da lâmina e comprimento da sépala. Esses componentes foram capazes de explicar a separação das quatro espécies, além da formação de dois grupos distintos nas populações de *S. goniorachis*. A análise genética foi realizada com oito microssatélites, em seis populações com um total de 145 indivíduos. A riqueza alélica variou de 4.054 em *S. costae* e 7.040 em *S. francae*. Os valores de heterozigosidade observada variaram de 0.557 em *S. goniorachis* e 0.667 em *S. francae*. O resultado da AMOVA revelou que 75.07% da variação genética está dentro das populações, e a ocorrência de fluxo gênico (N_m) variou de 0.285–8.370 entre os pares de populações estudadas. A análise bayesiana indicou que para as espécies *S. costae*, *S. francae* e *S. goniorachis* um modelo de $k = 4$ populações é capaz de explicar melhor a variação nos dados sobre a estrutura genética. O teste de mantel para análise de isolamento pela distância não revelou correlação entre distância genética e geográfica ($r = 0.044$ $P < 0.01$). Tanto as análises morfológicas quanto as

análises genéticas evidenciaram dois grupos distintos dentro das quatro populações de *S. goniorachis* analisadas. Isso levou a proposição de uma nova espécie de *Stigmatodon*, que apresenta características morfológicas peculiares em relação à distribuição de tricomas e pela postura da lâmina foliar revoluta. Para as análises de citometria de fluxo foram utilizadas amostras de folhas de 60 indivíduos, e para análise de citogenética foram utilizadas amostras de raízes de seis indivíduos. Nas análises de citometria de fluxo, o valor médio do conteúdo de DNA nuclear variou entre 1.485 a 1.597 pg entre todas as espécies analisadas. As análises citogenéticas apresentaram valores idênticos nas seis populações do complexo *S. goniorachis*, com $2n = 50$ cromossomos. As análises de citometria de fluxo não evidenciaram diferenças nas seis populações das quatro espécies que compõem o complexo *S. goniorachis*. Todas as espécies de nosso estudo estão enquadradas em algum grau de ameaça de acordo com a IUCN. Desta forma, estudos morfológicos e genéticos são ferramentas importantes para avaliar o grau de declínio e/ou conservação de populações destas espécies, além de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação do complexo *S. goniorachis*.

Palavras-chave: citogenética, genética de populações, *inselbergs*, morfologia, morfometria.

Rio de Janeiro, RJ

2021

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND GENETIC DIVERSITY IN *STIGMATODON* (TILLANDSIOIDEAE, BROMELIACEAE)

Vitor da Cunha Manhães

Orientadores: Dra. Andrea Ferreira da Costa & Dr. Fabiano Salgueiro

This thesis investigates the diversity in the *Stigmatodon goniorachis* complex, endemic to the inselbergs of the Atlantic Forest in the state of Rio de Janeiro, through the study of species and their populations regarding their morphological variation, genetic diversity, the amount of nuclear DNA and the number chromosomes. For the morphological analyzes, samples of leaves and flowers were collected from five individuals in each of the seven populations, totaling 35 individuals where 20 quantitative and seven qualitative variables were used in the cluster and ordering analyzes. The cluster analysis revealed the evident separation of the four species (*S. brassicoides*, *S. costae*, *S. goniorachis* and *S. francae*). In addition, in the populations of *S. goniorachis*, two distinct groups were formed. The PCA analysis revealed that the main variation components were the diameter of the peduncle, the length of the floral bract and the length of the receptacle. In the populations of *S. goniorachis* the main components of variation were the length of the floral bract, width of the blade and length of the sepal. These components were able to explain the separation of the four species, in addition to the formation of two distinct groups in the populations of *S. goniorachis*. Genetic analysis was performed with eight microsatellites, in six populations with a total of 145 individuals. The allelic wealth varied from 4.054 in *S. costae* and 7.040 in *S. francae*. The observed heterozygosity values varied from 0.557 in *S. goniorachis* and 0.667 in *S. francae*. The AMOVA result revealed that 75.07% of the genetic variation is within populations, and the occurrence of gene flow (N_m) ranged from 0.285–8.370 among the pairs of populations studied. The Bayesian analysis indicated that for the species *S. costae*, *S. francae* and *S. goniorachis* a model of $k = 4$ populations is able to better explain the variation in data on the genetic structure. The mantel test for isolation analysis by distance did not reveal any correlation between genetic and geographic distance ($r = 0.044$ $P < 0.01$). Both morphological and genetic analyzes showed two distinct groups within the four populations of *S. goniorachis* analyzed. This led to the proposition of a new species

of *Stigmatodon*, which has peculiar morphological characteristics in relation to the distribution of trichomes and the posture of the leaf blade revoluta. For flow cytometry analyzes, samples of leaves from 60 individuals were used, and for cytogenetics analysis, samples of roots from six individuals were used. In the flow cytometry analyzes, the average value of nuclear DNA content varied between 1,485 to 1,597 pg among all analyzed species. Cytogenetic analyzes showed identical values in the six populations of the *S. goniorachis* complex, with $2n = 50$ chromosomes. Flow cytometry analyzes did not show differences in the six populations of the four species that make up the *S. goniorachis* complex. All species in our study fall under some degree of threat according to the IUCN. Thus, morphological and genetic studies are important tools to assess the degree of decline and/or conservation of populations of these species, in addition to assisting in the development of conservation strategies for the *S. goniorachis* complex.

Keywords: cytogenetics, inselbergs, morphology, morphometry, population genetics.

Rio de Janeiro, RJ

2021

Estrutura da Tese

A tese está organizada da seguinte forma:

Inicialmente é apresentada uma **Introdução Geral** com informações sobre a família Bromeliaceae, do gênero *Stigmatodon* e das espécies do complexo *S. goniorachis*, que ocorrem exclusivamente em *inselbergs* da Floresta Atlântica. Também são levantadas hipóteses e considerações referentes as análises realizadas nos capítulos que se sucedem, a saber:

Capítulo 1: “*Transferability of nuclear microsatellite markers to Stigmatodon species, a bromeliad genus endemic to vertical cliffs of inselbergs in Brazil*”. Este capítulo teve como objetivo avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos para outras espécies, e testá-los nas espécies do complexo *S. goniorachis*, a fim de subsidiar as análises genéticas desenvolvidas no capítulo 2. Como na data de publicação deste artigo a descrição da espécie *S. francae* ainda não tinha sido oficialmente publicada, foi respeitado o código de nomenclatura botânica, e ela foi denominada neste trabalho como *Stigmatodon sp. nov.*

Capítulo 2: “*Evidências morfológicas e genéticas sobre o complexo Stigmatodon goniorachis (Tillandsioideae, Bromeliaceae), revelam uma nova espécie de inselbergs da Floresta Atlântica*”. Este capítulo avaliou a variação morfológica e genética de quatro espécies do complexo *S. goniorachis* em seis populações distintas, através de análises multivariadas e moleculares, com o objetivo de elucidar as diferenças existentes entre as espécies deste complexo. Com os resultados destas análises foi possível reconhecer uma nova espécie, aqui descrita como *Stigmatodon carioca sp. nov.*

Capítulo 3: “*Is there a variation in the content of nuclear DNA and number of chromosomes of species occurring in isolated inselbergs? A case study of the genus Stigmatodon (Tillandsioideae, Bromeliaceae)*”. Este capítulo teve como principal objetivo verificar se ocorre variação no conteúdo de DNA nuclear e no número de

cromossomos das espécies que compõem o complexo *S. goniorachis* em suas diferentes populações. Aqui, a fim de respeitar o código de nomenclatura botânica, estamos considerando a nova espécie *S. carioca sp. nov.* descrita no capítulo 2, como *Stigmatodon sp. nov.* tendo em vista que a descrição de *S. carioca sp. nov.* ainda não foi oficialmente publicada.

Por fim, são apresentadas as **Considerações Finais**, com comentários sobre todas as análises e sobre a utilidade destes resultados em futuros trabalhos abordando este complexo de espécies endêmico dos *inselbergs* da Floresta Atlântica.

Introdução Geral

Bromeliaceae Juss. é uma das maiores e mais representativas famílias de plantas do Neotrópico, constituindo um dos grupos com grandes variedades morfológicas e ecológicas entre as angiospermas (Givnish *et al.* 2011). Acredita-se que seu surgimento foi há cerca de 100 milhões de anos (Ma) no Escudo das Guianas, durante o período Cretáceo, e sua diversificação ocorreu há cerca de 19 Ma. Sua ampla distribuição geográfica em diferentes regiões e tipos de habitats desde méxicos a xéricos da América Tropical e Subtropical transcorreu por volta dos 15,4 Ma (Givnish *et al.* 2007, 2011, 2014; Krapp *et al.* 2014).

Com exceção de *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr., que ocorre na costa oeste do continente africano, os representantes da família Bromeliaceae distribuem-se exclusivamente na região neotropical (Smith & Downs 1974; Jaques-Felix 2000; Givnish *et al.* 2004). No Continente Americano, a família apresenta como limite norte de ocorrência os estados de Virgínia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos, e como limite sul o norte da Argentina (Smith & Downs 1974). Os representantes são encontrados praticamente em todos os ambientes, do nível do mar aos elevados altiplanos da cordilheira dos Andes, em florestas pluviais como a Floresta Atlântica, ou regiões áridas como a Caatinga. Na costa leste do Brasil ocorrem principalmente os grupos associados aos ambientes florestais, enquanto o escudo das Guianas reúne os gêneros relacionados à vegetação aberta. Atualmente quatro regiões são consideradas centros de diversidade genérica da família, são eles: a América Central, os Andes, o Planalto da Guianas, e a Floresta Atlântica (Forzza 2005; Zizka *et al.* 2020). O sucesso desta ampla distribuição em diferentes tipos de habitats é caracterizado por caracteres morfológicos e fisiológicos, tais como folhas dispostas em forma de roseta, propiciando o acúmulo de água e matéria orgânica, escamas absorventes de umidade atmosférica na lâmina foliar, o metabolismo do tipo CAM, e a polinização por vertebrados, especialmente beija-flores e morcegos (Tomlinson 1969; Benzing 2000; Givnish *et al.* 2007, 2014).

Atualmente Bromeliaceae reúne aproximadamente 3.657 espécies subordinadas a 78 gêneros (Gouda & Butcher 2021 [cont. upd]), distribuídas em oito subfamílias, sendo que três destas (Bromelioideae Harms, Pitcairnioideae Harms e Tillandsioideae Harms) já

eram reconhecidas tradicionalmente desde o século passado por Smith & Downs (1974, 1977, 1979). As outras cinco subfamílias foram estabelecidas na última década por Givnish *et al.* (2007, 2011) com auxílio de ferramentas moleculares e morfológicas (Brochinioideae Givnish, Hecthioideae Givnish, Lindmanioideae Givnish, Navioideae Harms e Puyoideae Givnish). Dentre todas essas subfamílias, Tillandsioideae abarca a maior diversidade com cerca de 1.503 espécies e 23 gêneros conhecidos até o momento (Gouda & Butcher 2021 [cont. upd.]). Essas espécies estão distribuídas desde o sul da América do Norte até o sul da América do Sul (Smith & Downs 1977; Zizka *et al.* 2020), onde habitam diversos tipos de ambientes, sejam eles méxicos ou xéricos (Benzing 2000; Barfuss *et al.* 2016).

No Brasil a família está representada por 1.379 espécies inseridas em 56 gêneros distribuídos por todos os seis Domínios Fitogeográficos, sendo que 1178 espécies e 24 gêneros são endêmicos do país (Forzza *et al.* 2021). A Floresta Atlântica é considerada um dos *hotspots* para a conservação devido ao seu alto grau de endemismo e diversidade de espécies (Myers *et al.* 2000; Mittermeier *et al.* 2004), sendo um dos centros de diversidade da família no Brasil. Neste domínio, a família Bromeliaceae está representada por 934 espécies e 35 gêneros (Forzza *et al.* 2021), sendo 85% destas espécies endêmicas do país. Dentre esses gêneros, nove são endêmicos da Floresta Atlântica (*Canistropsis* (Mez) Leme, *Canistrum* E.Morren, *Edmundoa* Leme, *Fernseea* Baker, *Lymania* Read, *Nidularium* Lem, *Portea* K. Kock, *Quesnelia* Gaudich. e *Wittrockia* Lindm.) englobando 806 espécies (Martinelli *et al.* 2008). Grande parte das espécies de Bromeliaceae ocorrentes na Floresta Atlântica, distribuem-se na região sudeste do Brasil e no sul do estado da Bahia (Martinelli *et al.* 2008), áreas que revelam alta riqueza e elevado endemismo de espécies. Além disso, alguns desses locais apresentam espécies com distribuição geográfica restrita e disjunta (Versieux & Wendt 2006; De Paula *et al.* 2016; Couto 2017). Devido a estes aspectos, essas regiões são consideradas modelos para investigações de processos evolutivos, além de revelarem excelentes sistemas para estudos sobre a evolução do isolamento reprodutivo das espécies (Van der Niet *et al.* 2006; Wendt *et al.* 2008).

Espécies de Bromeliaceae com distribuição geográfica restrita habitualmente são observadas, por exemplo, em *inselbergs* (Forzza *et al.* 2021), que são afloramentos

rochosos de granito e gnaiss considerados “ilhas terrestres” devido ao seu alto grau de isolamento (Porembski & Barthlott 2000; Guerra 2001). Nesses ambientes Bromeliaceae destaca-se pela alta riqueza de espécies (Forzza *et al.* 2021), estimada em 102 táxons circunscritos em 10 gêneros (De Paula *et al.* 2020). A maioria dessas espécies (cerca de 80%) está restrita ao Domínio da Floresta Atlântica. *Inselbergs* são frequentemente encontrados na região sudeste do Brasil e possuem floras muito distintas daquelas observadas na vegetação de seu entorno (Porembski *et al.* 1998). Esses locais apresentam um ambiente extremamente xérico, com formação de paisagens muito antigas na Floresta Atlântica (Safford & Martinelli 2000; Porembski 2007; De Paula *et al.* 2016; Porembski *et al.* 2016), surgindo a cerca de 625 e 490 Ma (Gradim *et al.* 2014; Varajão & Alkmim 2015). A exposição deste tipo de formação pode ter ocorrido através de processos erosivos por volta de 20-2,6 Ma, no início do Neoceno, podendo ter sido moldados através de movimentos tectônicos recentes, contribuindo para a formação escultural atual dos *inselbergs* (Varajão & Alkmim 2015). A ocupação e distribuição de linhagens de Bromeliaceae ocorreu por volta dos 15-10 Ma (Givnish *et al.* 2014), principalmente através das oscilações do Pleistoceno/Plioceno, que podem ter contribuído para a diversidade atual de espécies na América do Sul (Turchetto-Zolet *et al.* 2013). As formações de *inselbergs* apresentam características ecológicas peculiares e limitantes para diversas espécies, como por exemplo, elevada incidência de radiação solar, baixa concentração hídrica, elevadas taxas de evapotranspiração, e pequenas ou mesmo inexistentes porções de solo e substrato (Porembski 2007). Essas características ecológicas encontradas nos *inselbergs* acabam influenciando os processos evolutivos das espécies que ocorrem nesses locais, em contraste com a matriz circundante dessas áreas (Hopper 2009). Tais processos atuam como filtros ambientais na seleção e adaptação de espécies, acarretando em uma vegetação altamente especializada que apresenta alto grau de endemismo (Porembski 2007).

Os *inselbergs* desempenham um papel importante na diversificação de várias espécies rupícolas, representando excelentes modelos para compreensão da coesão e/ou separação de linhagens que se distribuem isoladamente nessas áreas. A família Bromeliaceae apresenta elevada diversidade nesses ambientes, e abordagens moleculares com espécies desta família são cada vez mais frequentes nesses locais, como observado

nos gêneros *Alcantarea* (Barbará *et al.* 2007a, 2008, 2009; Lexer *et al.* 2016), *Encholirium* (Hmeljevski *et al.* 2015, 2017; Gonçalves-Oliveira *et al.* 2017), e *Pitcairnia* (Palma-Silva *et al.* 2011; Hmeljevski *et al.* 2014; Manhães *et al.* 2019; Mota *et al.* 2019). Os resultados desses estudos indicam que a forma de distribuição isolada e disjunta em *inselbergs*, pode provocar a diferenciação e estruturação genética de populações, em consequência do baixo fluxo gênico entre as localidades (Barbará *et al.* 2007b). Essas análises evidenciam a grande importância dos *inselbergs* em estudos que envolvem a diversidade morfológica e molecular para o entendimento da radiação adaptativa de espécies em variados ecossistemas, como observado nas diferentes espécies da família Bromeliaceae (Barbará *et al.* 2007b).

De acordo com Hopper *et al.* (2016) os *inselbergs* também podem ser reconhecidos como paisagens de *Ocbil*, (do inglês *old-climatically buffered infertile landscapes*) que são caracterizadas por locais inférteis, muito antigos, e intrinsecamente associados a estabilidades do clima e das rochas. Em grande parte, essas localidades estão distribuídas em algum tipo de *hotspot* global de biodiversidade, como, por exemplo, a Floresta Atlântica, e, portanto, são necessárias diretrizes e atenção especial nos esforços de conservação dessas importantes áreas (Hopper *et al.* 2016; Porembski *et al.* 2016; De Paula *et al.* 2016; Hmeljevski *et al.* 2017). Frequentemente estes *inselbergs* estão inseridos em propriedades particulares, fora de Unidades de Conservação, estando vulneráveis a diversas ações, como extrativismo ilegal para fins comerciais, queimadas, exploração de rochas ornamentais, etc. (Coffani-Nunes 2002; Martinelli 2007, Porembski 2007). A invasão por espécies exóticas é outro fator que pode ser impactante à vegetação destes *inselbergs* (Porembski *et al.* 1998; Benzing. 2000; Versieux *et al.* 2010a; Marques *et al.* 2012). Devido ao seu alto índice de endemismo são considerados áreas prioritárias para conservação, porém ainda é notória a carência de informações biológicas sobre esses ambientes (Martinelli 2007; Porembski *et al.* 2016; De Paula *et al.* 2016).

Diante da grande variedade de habitats que ocorrem nesses *inselbergs* (Safford & Martinelli 2000; Porembski 2007; De Paula *et al.* 2016), os ecossistemas de penhascos, que estão localizados nas vertentes mais íngremes, apresentam grande importância ecológica,

mas também grande dificuldade de acesso, o qual ocorre exclusivamente com equipamentos de escalada (Larson *et al.* 2000). Essas áreas verticalizadas são diretamente influenciadas pela ação da gravidade, que atua fortemente na remoção de substrato e água da superfície rochosa, tornando-se um hábitat xérico e pobre em nutrientes (Larson *et al.* 2000). Tais características atuam como filtro na seleção e na ocupação de uma vegetação altamente especializada, comportando espécies endêmicas e sensíveis a impactos e/ou desastres naturais como o fogo, mas sobretudo antrópicos, como por exemplo abertura de vias de escalada com a remoção de vegetação local (Carauta & Oliveira 1984; Camp & Knight 1998; Larson *et al.* 2000; Hans-Peter *et al.* 2004; Kuntz & Larson 2006; Adams & Zaniewski 2012; Clark & Hells 2015; Studlar *et al.* 2015; Aximoff *et al.* 2016; Corrêa *et al.* 2019).

O Rio de Janeiro se destaca como o estado da federação com maior riqueza de espécies e endemismos para Bromeliaceae (Martinelli *et al.* 2008). Atualmente são encontrados 26 gêneros e 330 táxons no estado (Forzza *et al.* 2021). Deste total, 15 gêneros e 73 espécies ocorrem exclusivamente em vegetação sobre afloramentos rochosos ou em *inselbergs* (Forzza *et al.* 2021). O gênero *Stigmatodon* Leme, G.K. Br. & Barfuss distribuiu-se unicamente nos penhascos verticais dos *inselbergs* da Floresta Atlântica, em altitudes que variam de 50 a 1000 metros sobre o mar e até o momento com a ocorrência de cinco espécies em todo estado do Rio de Janeiro (Couto 2017; Forzza *et al.* 2021).

O gênero *Stigmatodon* foi descrito recentemente tendo sido segregado de *Vriesea* Lindl. (Tillandsioideae, Bromeliaceae) (Barfuss *et al.* 2016). Este gênero, engloba 26 espécies que ocorrem exclusivamente nas faces verticais dos *inselbergs* no domínio da Floresta Atlântica no sudeste do Brasil nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e no Espírito Santo onde ocorre o principal centro de diversidade do gênero, e nos afloramentos rochosos dos campos rupestres nos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco, na região nordeste do Brasil (Couto *et al. in prep.*). Com habitat exclusivamente rupícola, suas espécies apresentam folhas fortemente coriáceas com indumento lepidoto denso, lâminas geralmente triangulares, inflorescências com flores secundas, estames inclusos, organizados em três para cada lado da corola, e geralmente apresentam estigma tubo-

laciniado, único entre as Tillandsioideae (Leme & Brown, 2004; Leme *et al.* 2010; Leme 2012; Leme *et al.* 2014; Barfuss *et al.* 2016; Couto *et al. in prep*). Muitas das espécies de *Stigmatodon* apresentam grande proximidade morfológica, o que torna difícil a delimitação de certos táxons, resultando em problemas na identificação e circunscrição destas espécies (Couto 2017).

Stigmatodon possui quatro espécies de ocorrência exclusiva nos *inselbergs* da região metropolitana do Rio de Janeiro (figura 1). São elas: *Stigmatodon brassicoides* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss, *S. costae* (B.R.Silva & Leme) Leme, G.K.Br. & Barfuss, *S. francae* D.R. Couto, Manhães & A.F. Costa, e *S. goniorachis* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss, a partir daqui denominado complexo *Stigmatodon goniorachis*. Os quatro táxons apresentam variações na postura, cor e indumento das lâminas foliares, assim como na forma e na cor das brácteas florais. Em geral, *S. brassicoides* possui menores dimensões em relação às demais. Entre as quatro, *S. goniorachis* é a que apresenta distribuição um pouco mais ampla e forma as maiores populações. Além disso, podem ser observados alguns indivíduos com inflorescência composta. *Stigmatodon costae* é conhecida apenas para a localidade-tipo, no Morro do Tucum, em Itacoatiara, Niterói, onde forma extensa população na face sul deste *inselberg*. Dentre as quatro espécies, *S. francae* é a que possui as maiores dimensões, além de possuir inflorescência sempre composta. É conhecida apenas para localidade-tipo, na Pedra do Hime, em Jacarepaguá, Rio de Janeiro, formando extensa população na face norte do *inselberg*.



Figura 1. Espécies foco do estudo encontradas na região metropolitana do Rio de Janeiro. (A) *S. brassicoides*, (B) *S. costae*, (C) *S. francae*, (D) *S. goniorachis* (Imagens: V.C. Manhães e Bruce Dustan).

Vale ressaltar que os dados constantes nas coleções de herbário e na literatura indicam que as quatro espécies não ocorrem em simpatria em um mesmo *inselberg*. Porém, este complexo ocorre em um conjunto de *inselbergs* litorâneos próximos uns dos outros, com distância mínima de 1.5 km e com máxima de 49 km, e isolados do principal centro de diversidade do gênero no Espírito Santo (figura 2). Uma das principais razões pela qual estas espécies permaneceram pouco estudadas desde as suas descrições, deve-se à dificuldade de acessar seus locais de ocorrência, que geralmente demandam a necessidade de profissionais treinados no uso de equipamentos específicos para escalada.

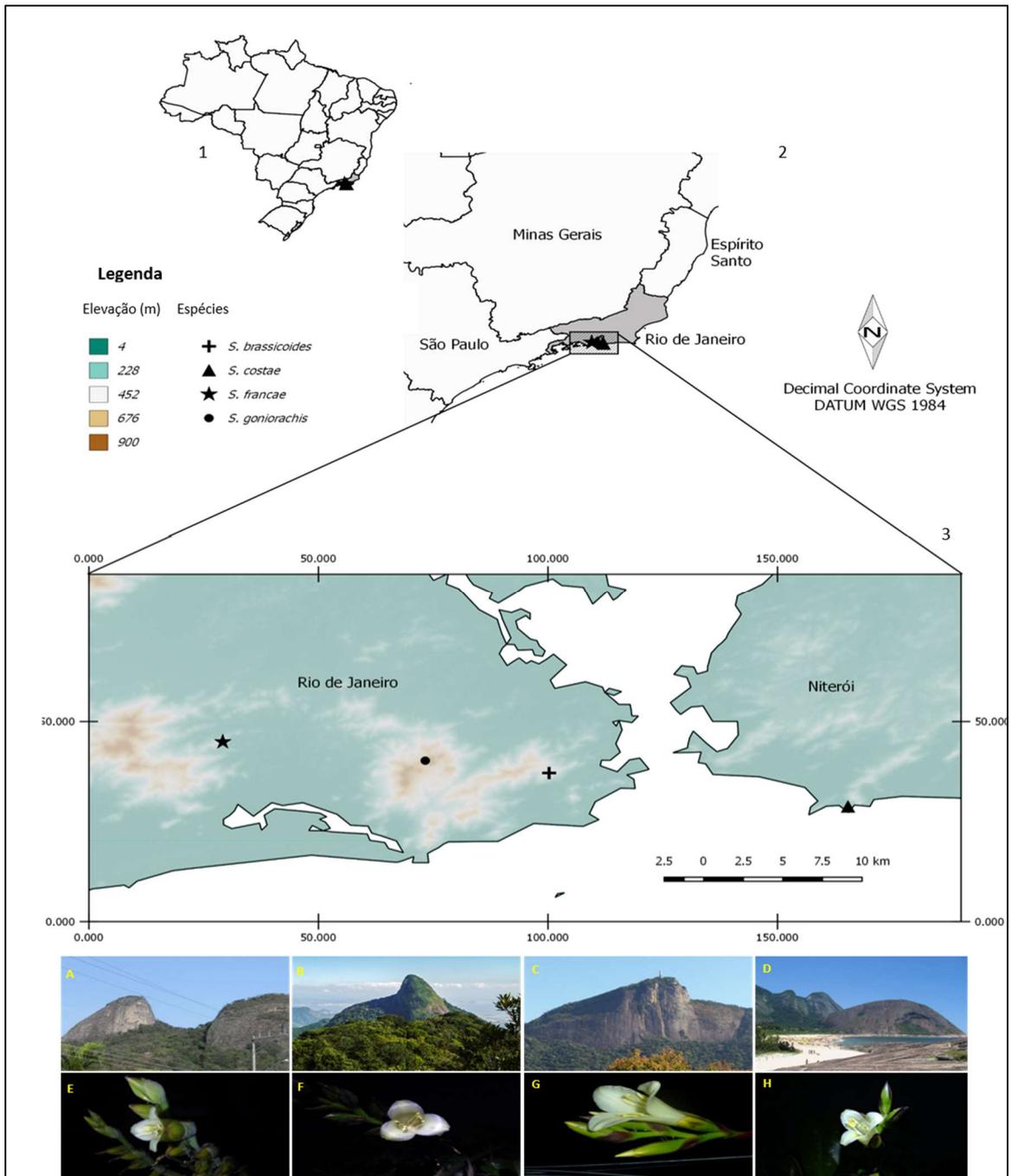


Figura 2. Distribuição das localidades tipo das quatro espécies na região metropolitana do Rio de Janeiro. 1 - Brasil, 2 - Região Sudeste, 3 - Cidades do Rio de Janeiro e Niterói. A e E - Pedra do Hime (PH) - *S. francae*; B e F - Pico da Tijuca (PT) - *S. goniorachis*; C e G - Morro do Corcovado (MC) - *S. brassicoides*; D e H - Morro do Tucum (MT) - *S. costae*.

A variação morfológica associada à distribuição geográfica apresenta um contexto evolutivo evidente, em que as adaptações de um organismo estão diretamente ligadas ao ambiente em que vivem. Além disso, a variação nas características morfológicas pode ser reflexo da plasticidade fenotípica das espécies em virtude do ambiente em que se encontram (Ricklefs 2003). Uma forma de avaliar a variação morfológica são os estudos morfométricos, pois fornecem dados informativos para a delimitação de táxons, além de avaliar quais características são mais conservadas e que possuem maior importância na identificação de grupos (Peres-Neto 1995; Newmaster *et al.* 2008). Por outro lado, é possível verificar se a variação morfológica dentro de determinados grupos é associada à descontinuidade evidente entre as espécies propostas, ou se está relacionada com os gradientes populacionais ao longo de uma faixa de distribuição geográfica restrita (Small & Fawzy 1992).

Métodos estatísticos multivariados são amplamente utilizados quando envolvem a delimitação de espécies, auxiliando na análise dos dados morfométricos e na inferência sobre a correlação existente entre a distribuição geográfica e a variação morfológica. As análises multivariadas foram empregadas em várias famílias de angiospermas, com o objetivo de elucidar problemas taxonômicos (por exemplo, Hess & Stoyhoff 1998; Naczi *et al.* 1998; Cardim *et al.* 2001; Nielsen *et al.* 2003; Goldman *et al.* 2004; Henderson 2005; Trovó *et al.* 2008). Em Bromeliaceae, estes métodos foram usados para delimitar espécies em *Billbergia* (Jacques 2015), *Dyckia* (Guarçoni *et al.* 2014), *Pitcairnia* (Wendt *et al.* 2000), *Tillandsia* (Paixão-Souza 2012; Castello & Galetto 2013) e *Vriesea* (Costa *et al.* 2009; Neves *et al.* 2018; Uribe *et al.* 2020).

Investigações referentes às espécies de Bromeliaceae em *inselbergs* na Floresta Atlântica são cada vez mais frequentes (Barbará *et al.* 2007a, 2009; Palma-Silva *et al.* 2009, 2011; Hmeljevski *et al.* 2014, 2015, 2017; Lexer *et al.* 2016; Manhães *et al.* 2019; Mota *et al.* 2019), mas ainda são poucos frente à riqueza de espécies desta família nestes ambientes. Uma das possíveis causas que levam a este cenário pode ser a lacuna de coleta devido ao difícil acesso a estes locais (Manhães *et al.* 2016). No entanto, tal fato pode se dever à distribuição global restrita destes táxons. É possível que espécies de *inselbergs*

consideradas endêmicas de uma ou poucas localidades estejam, na realidade, com sua distribuição geográfica subestimada pela carência de coletas. Ampliar o esforço de coleta de representantes de Bromeliaceae em *inselbergs* e, conseqüentemente, ampliar a distribuição global de espécies é prioritário ao desenvolvimento de estudos de diversidade genética de populações, os quais, por sua vez, permitirão o melhor entendimento do *status* de conservação dessas espécies.

Devido à sua maior praticidade, atualmente os marcadores moleculares mais usados em análises de diversidade genética vegetal são aqueles baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Entre eles destacam-se os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Litt & Luty 1989), uma categoria de marcadores altamente informativos por apresentarem natureza multialélica, alta reprodutibilidade, herança co-dominante, alta abundância e extensa cobertura do genoma. Entretanto, a principal limitação ao uso de tais marcadores para análises genéticas em diversas espécies é o elevado custo para o desenvolvimento de *primers* específicos. Uma alternativa para eliminar este inconveniente seria à amplificação heteróloga de *loci* SSRs utilizando *primers* previamente descritos na literatura. Os marcadores SSRs podem ser transferidos entre espécies próximas e até mesmo entre gêneros próximos, reduzindo consideravelmente os custos de sua utilização (Ferreira & Grattapaglia 1998). A transferibilidade de SSRs tem sido relatada para várias famílias de plantas, incluindo Fabaceae (Peakall *et al.* 1998; Kölliker *et al.* 2001), Cucurbitaceae (Katzir *et al.* 1996), Poaceae (Röder *et al.* 1995; Thiel *et al.* 2003), Solanaceae (Provan *et al.* 1996; Nagy *et al.* 2007; Moon *et al.* 2008), Euphorbiaceae (Yu *et al.* 2011) e Bromeliaceae (Sarhou *et al.* 2003; Barbará *et al.* 2007a; Paggi 2008; Palma-Silva *et al.* 2011; Wörhmann & Weising 2011; Zanella *et al.* 2012; Goetze *et al.* 2013; Hmeljevski 2013; Lavor *et al.* 2014; Neri *et al.* 2015; Ferreira *et al.* 2017; Chaves *et al.* 2018; Zenk *et al.* 2018; Manhães *et al.* 2019; Tumi *et al.* 2019).

Recentemente alguns trabalhos sobre Bromeliaceae foram desenvolvidos utilizando marcadores moleculares microssatélites em biomas do Brasil como a Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado e Caatinga, principalmente em afloramentos rochosos

(Barbará *et al.* 2007a; Barbará *et al.* 2007b; Palma-Silva *et al.* 2009, 2011; Boisselier-Dubayle *et al.* 2010; Zanella *et al.* 2011; Miranda *et al.* 2012; Lavor *et al.* 2014; Hmeljevski *et al.* 2014, 2015, 2017; Gonçalves-Oliveira *et al.* 2017; Manhães *et al.* 2019; Mota *et al.* 2019). Estes estudos abordam principalmente a diversidade e estrutura genética populacional das espécies, elucidando processos evolutivos como especiação e hibridação, registrados em Bromeliaceae. Esses processos genético-evolutivos podem ser estabelecidos por distribuições geográficas restritas e/ou disjuntas, alterações ecológicas ou morfológicas, sendo que nessas condições os mecanismos de seleção natural e deriva genética aleatória atuam de maneira intensa (Petit & Excoffier 2009). Tais condições podem desencadear na divisão de populações em unidades evolutivas independentes, envolvendo a separação genética e ampliando a diferenciação fenotípica (Coyne & Orr 2004; Duminil & Michele 2009; Padial *et al.* 2010).

Além das ferramentas morfológicas e genéticas na determinação da circunscrição das espécies, a quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (Ebert & Till 1997; Ramírez-Morillo & Brown, 2001; Sgorbati *et al.* 2004; Favoreto *et al.* 2012; Bennet & Leitch 2012; Gitaí *et al.* 2014; Moura *et al.* 2018; Müller *et al.* 2019) e a caracterização dos cromossomos (Cotias-de-Oliveira *et al.* 2000; Ramírez-Morillo & Brown 2001; Palma-Silva *et al.* 2004; Bellintani *et al.* 2005; Gitaí *et al.* 2005, 2014; Ceita *et al.* 2008; Louzada *et al.* 2010; Nunes *et al.* 2013; Nunes & Clarindo 2014), são consideradas ferramentas importantes na abordagem evolutiva e taxonômica da família.

A citometria de fluxo (FCM) permite estimar o conteúdo de DNA, ampliando as informações sobre o genoma de Bromeliaceae, e tem contribuído significativamente em estudos de taxonomia, evolução (Ebert & Till 1997; Ramírez-Morillo & Brown 2001; Moura *et al.* 2018; Müller *et al.* 2019), biologia reprodutiva e diversidade genética (Sgorbati *et al.* 2004). Já a caracterização cromossômica permite a detecção de poliploides e híbridos, comumente reportados em Bromeliaceae (Palma-Silva *et al.* 2011; Gitaí *et al.* 2014; Nunes & Clarindo 2014; Lavania 2020), permitindo o melhor entendimento acerca das relações de parentesco entre espécies e diversificação de linhagens. Em Bromeliaceae, Marchant (1967); Cotias-de-Oliveira *et al.* (2000); Bellintani *et al.* (2005); Gitaí *et al.*

(2014) e Nunes & Clarindo (2014) mostraram que a maioria das espécies desta família possuem $2n=50$ cromossomos. Contudo, outros trabalhos reportam uma variação no número de cromossomos, como no gênero *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. com $2n=34$ (Marchant 1967; Ramírez-Morillo & Brown 2001; Ceita *et al.* 2008) e $2n=100$ para *Orthophytum amoenum* (Ule) L.B. Sm. (Bellintani *et al.* 2005), *Orthophytum albopictum* Philcox (Cotias-de-Oliveira *et al.* 2004; Louzada *et al.* 2010), *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez (Cotias-de-Oliveira *et al.* 2004) e *Orthophytum burle-marxii* L.B. Sm. & R.W.Read. E em *Pitcairnia scepstrigera* Mez e no gênero *Fosterella* L.B. Sm. com $2n= 50$, 100 e 150 (Paule *et al.* 2017). Esta variação também foi observada em *P. flammea* Lindl., na qual Nunes *et al.* (2013) encontraram $2n= 50$ e Gitaí *et al.* (2014) relataram a presença de $2n= 50$ e $2n= 100$ cromossomos respectivamente. No entanto, das 3.645 espécies de Bromeliaceae existentes, apenas cerca de 2% possuem o valor de conteúdo de DNA estimado, enquanto apenas cerca de 10% tiveram seu cariótipo estudado (Gitaí *et al.* 2014). Aliar a citometria de fluxo à caracterização cromossômica das espécies estudadas neste trabalho permitirá investigar a existência de variações tanto no conteúdo de DNA nuclear, como no número de cromossomos das espécies que compõem este grupo de espécies. Este tipo de informação é crucial ao entendimento e interpretação das análises de diversidade genética. Além disso, a citometria de fluxo é uma ferramenta complementar à citogenética, por meio da qual é possível quantificar o conteúdo de DNA de grande quantidade de indivíduos de uma população ou linhagem, permitindo direcionar a amostragem para realização dos estudos citogenéticos.

O conhecimento de como a variação morfológica, genética e cromossômica de determinada espécie está distribuída em suas populações é essencial para o estabelecimento de estratégias de conservação (Sites & Marshall 2003, 2004; Barbará *et al.* 2007b). O interesse pelo desenvolvimento de estudos com espécies de Bromeliaceae em *inselbergs* provavelmente é devido à alta representatividade da família nestes ambientes que apresenta alta riqueza de espécies e altos níveis de endemismo (Porembski *et al.* 1998, Porembski & Barthlott 2000; Porembski 2007; Couto *et al.* 2013; De Paula *et al.* 2016). Devido a estes aspectos, o sudeste do Brasil é considerado um dos três *hotspots* de diversidade de plantas em *inselbergs* no mundo (Porembski 2007). Grande parte das espécies que ocorre nesses

locais apresenta alto grau de endemismo (Ribeiro & Freitas 2010). No entanto, essas áreas ainda carecem de estudos e proteção. De acordo com a mais recente lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (Martinelli & Moraes 2013), cerca de 60 táxons com ocorrência em *inselbergs* graníticos estão categorizadas em algum grau de ameaça. Estes ambientes geralmente abrigam espécies endêmicas ou de distribuição restrita, conhecidas por poucas ou mesmo uma única localidade (Martinelli 2007), e entender aspectos relacionados à biologia destes táxons é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de conservação. Além disso, espécies cuja distribuição é exclusiva à *inselbergs* são excelentes modelos para estudos evolutivos, pois se distribuem de forma disjunta e isolada, apresentando elevados graus de endemismo e particularidades ecológicas únicas (Porembski & Barthlott 2000).

Esforços de campo para preenchimento de lacunas de coleta, e geração de informações sobre a distribuição geográfica, variação morfológica, diversidade genética e caracterização cromossômica, são de fundamental relevância para ampliação do conhecimento sobre a flora de *inselbergs*. Além disso, essas informações podem subsidiar de forma contundente a avaliação do *status* de conservação das espécies e do levantamento de informações úteis à elaboração de estratégias de conservação destes ambientes.

Desta forma, a presente tese busca entender se a natureza isolada dos *inselbergs*, o tipo de ambiente e de habitat característicos desses ecossistemas estão influenciando e /ou alterando os padrões morfológicos e genéticos de espécies que compõem o complexo *S. goniorachis*, utilizando-se de diferentes ferramentas para testar as seguintes hipóteses:

HIPÓTESES

- A distribuição geográfica isolada e disjunta, em conjunto com as características ambientais particulares de cada *inselberg* onde as populações do complexo *S. goniorachis* ocorrem, podem influenciar e alterar as características morfológicas dessas espécies.
- Os níveis de diversidade genética nessas populações são baixos, e há uma alta estruturação genética populacional, influenciados principalmente pela distribuição geográfica disjunta e isolada, e conseqüentemente pelos baixos níveis de fluxo gênico entre as populações.
- O conteúdo médio de DNA nuclear e o número cromossômico nas populações das espécies do complexo *S. goniorachis* pode ser variável, provocado pelas diferenças ambientais e pela forma e da natureza isolada dos *inselbergs* onde essas espécies estão localizadas.

Referências bibliográficas padronizadas de acordo com o periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Referências

Adams MD, Zaniewski K. 2012. Effects of recreational rock climbing and environmental variation on a sandstone cliff-face lichen community. *Botany* **90**: 253-259.

Aximoff IA, Bovini MG, Fraga CN. 2016. Vegetação em afloramentos rochosos litorâneos perturbados por incêndios na região metropolitana fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Biodiversidade Brasileira* **6(2)**: 149-172.

Barbará T, Palma-Silva C, Paggi, GM, Bered, F, Fay MF, Lexer C. 2007a. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**: 3759-3767.

Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C. 2007b. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude inselbergs, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* **16**: 1981-1992.

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

Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S, Lexer, C. 2009. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* **103**: 65-77.

- Barfuss MHJ, Till W, Leme EMC, Pizón JP, Manzanares JM, Halbritter H, Samuel R, Brown GK. 2016.** Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* **279**: 001-097.
- Bellintani MC, Assis JG, Oliveira ALC. 2005.** Chromosomal evolution of Bromeliaceae. *Cytologia* **70**:129-133.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2012.** Nuclear DNA amounts in angiosperms - targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany* **107**: 467-590
- Benzing D. 2000.** Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press, London.
- Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C. 2010.** Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography* **33**: 175-184.
- Camp RJ, Knight RL. 1998.** Effects of rock climbing on cliff plant communities at Joshua Tree National Park, California. *Conservation Biology* **12(6)**: 1302-1306.
- Carauta JPP, Oliveira RR. 1984.** Plantas vasculares dos morros da Urca, Pão de Açúcar e Cara de Cão. *Rodriguésia* **36**: 13-24.
- Cardim DC, Carlini-Garcia LA, Mondin M, Martins M, Veasey EA, Ando A. 2001.** Intraspecific variability in five populations of *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae - Oncidiinae) in Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica* **24(4)**: 553-560.
- Castello LV, Galetto L. 2013.** How many taxa can be recognized within the complex *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae, Tillandsioideae)? Analysis of the available classifications using a multivariate approach. *Phyto Keys* **23**: 25-39.

- Ceita GO, Assis JGA, Guedes MLS, Cotias-de-Oliveira ALPC. 2008.** Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **158**:189-193.
- Chaves JNC, Aoki-Gonçalves F, Leal BSS, Rossatto DR, Palma-Silva C. 2018.** Transferability of nuclear microsatellite markers to the atmospheric bromeliads *Tillandsia recurvata* and *T. aeranthos* (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Botany* **41**: 931-935
- Clark P, Hells A. 2015.** The effects of rock climbing on cliff-face vegetation. *Applied Vegetation Science* **18**: 705-715.
- Coffani-Nunes JV. 2002.** Bromélias. In: Simões LL & Lino CF. (eds.) Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus recursos florestais. São Paulo: SENAC: 119-132.
- Corrêa AM, Neto WMP, Alves LA. 2019.** Plant blindness on climbing trails in Rio de Janeiro city conservation units. *Research Society and Development*. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i2.2186>
- Costa AF, Rodrigues PJFP, Wanderley MGL. 2009.** Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 163-181.
- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Bellintani MC, Andrade JCS, Guedes MLS. 2000.** Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* **23**:173-177.
- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Ceita GO, Palmeira ACL, Guedes MLS. 2004.** Chromosome number for Bromeliaceae species occurring in Brazil. *Cytologia* **69**:161-166
- Coyne JA, Orr HA. 2004.** Speciation. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- Couto DR, Manhães VC, Favoreto FC, Faria APG. 2013.** Checklist of the Bromeliaceae from Pedra dos Pontões, Mimoso do Sul, Espírito Santo, Brazil, with four first records for the state. *Biota Neotropica* **13(4)**: 113-120.
- Couto DR. 2017.** Revisão taxonômica e filogenia de *Stigmatodon* Leme, G.K. BR. & Barfuss (Bromeliaceae – Tillandsioideae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional.
- Couto DR, Kessous IM, Neves B, Paixão-Souza B, Faria CG, Barfuss MHJ, Sagueiro F, Sá-Haidad, Costa AF. In prep..** Molecular phylogenetics and character evolution in *Stigmatodon* (Bromeliaceae, Tillandsioideae), an endemic genus to Brazilian rocky outcrops. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- De Paula LFA, Azevedo LO, Mauad LP, Cardoso LJT, Braga MA, Kollmann JC, Fraga CN, Neto LM, Labiak PH, Mello-Silva R, Porembski S, Forzza RC. 2020.** Sugarloaf Land in south-eastern Brazil: a tropical hotspot of lowland inselberg plant diversity. *Biodiversity Data Journal* **8**: e53135.
- Duminil J, Michele MD. 2009.** Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems* **143**: 528-542.
- Ebert I, Till W. 1997.** Nuclear genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) with emphasis on the genus *Pitcairnia*. Abstracts, angiosperm genome size discussion meeting, 11–12 September, pp 15. *Royal Botanical Gardens, Kew*.
- Favoreto FC, Carvalho CR, Lima ABP, Ferreira A, Clarindo WR. 2012.** Genome size and base composition of Bromeliaceae species assessed by flow cytometry. *Plant Syst Evol* **298**:1185-1193.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p.
- Ferreira MCF, Neri J, Palma-Silva C, Pinangé S, Benko-Iseppon AM, Louzada RB. 2017.** Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in two species of

Cryptanthus Otto and A. Dietr. (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Botany* **40**: 475-480.

Forzza RC. 2005. Revisão Taxonômica de *Encholirium* Mart. Ex Schult. & Schult.f. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* **23**: 1-49.

Forzza RC, Costa AF, Maciel JR, Kessous IM, Monteiro RF, Faria APG, Tardivo RC, Büneker HM, Saraiva DP, Moreira BA, Jacques SSA, Almeida MM, Santos-Silva F, Louzada RB, Moura RL, Couto DR, Neves B, Oliveira FMC, Araújo CC, Gonçalves-Oliveira RC, Versieux LM, Romanini RP, Machado TM, Silva RSA, Paixão-Souza B, Gomes-da-Silva J, Uribbe FP, Guarçoni EAE, Sousa LOF, Pontes RAS, Nogueira MGC, Sousa GM, Koch AK, Picanço WL, Cardoso PH, Martins SE, Barbosa-Silva RG, Wanderley MGL. *Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>. Acesso em: 08 fev. 2021.

Gitai J, Horres R, Benko-Iseppon AM. 2005. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Systematics and Evolution* **253**: 65-80.

Gitai J, Paule J, Zizka G, Schulte K, Benko-Iseppon AM. 2014. Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. *Botanical Journal of the Linnean Society* **176**: 349-368.

Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE, Sytsma KJ. 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Science* **165**: S35-S54.

- Givnish TJ, Millan KC, Berry PE, Stysma KJ. 2007.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* **23**: 3-26
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Benjamin EEV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* **98**: 872-895.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Benjamin EEV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2014.** Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetic and Evolution* **71**: 55-78.
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C. 2013.** Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochemical Systematics and Ecology* **48**: 194-198.
- Goldman, DH, Berg CVD, Grith MP. 2004.** Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R.Br. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **247**: 37-60.
- Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Krapp F, Alves M, Wanderley MGL, Weising K. 2017.** Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *American Journal of Botany* **104(6)**: 1-11.

- Gouda EJ, Butcher D. (cont. updated).** *A List of Accepted Bromeliaceae Names* [<http://bromeliad.nl/bromNames/>]. University Botanic Gardens, Utrecht (accessed: 27-01-2021).
- Gradim C, Roncato J, Pedrosa-Soares AC, Cordani U, Dussin I, Alkmim FF, Babinski M. 2014.** The hot back-arc zone of the Araçuaí orogen, Eastern Brazil: From sedimentation to granite generation. *Brazilian Journal of Geology* **44**: 155-180.
- Guerra AT. 2001.** Novo dicionário Geológico – Geomorfológico. 2 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil.
- Guarçoni EAE. 2014.** Estudos taxonômicos e de anatomia foliar de espécies de *Dyckia* Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Hans-Peter R, Müller SW, Baur B. 2004.** Effects of rock climbing on plant communities on exposed limestone cliffs in the Swiss Jura mountains. *Applied Vegetation Science* **7**: 35-40.
- Henderson A. 2005.** A multivariate study of *Calyptrogyne* (Palmae). *Systematic Botany* **30**: 60-83.
- Hess WJ, Stoyhoff NA. 1998.** Taxonomic status of *Quercus acerifolia* (Fagaceae) and a morphological comparison of our members of the *Quercus schumardii* complex. *Systematic Botany* **23**: 89-100.
- Hmeljevski KV. 2013.** Biologia reprodutiva, genética de populações e filogeografia de *Encholirium horridum* (Bromeliaceae) em *inselbergs* graníticos da Mata Atlântica. Tese doutorado. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.
- Hmeljevski KV, Freitas L, Domingues R, Pereira AR, Cancio AS, Andrade ACS, Machado MA, Viccini LF, Forzza RC. 2014.** Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based

conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. *Flora* **209**: 250-259.

Hmeljevski KV, Reis MS, Forzza RC. 2015. Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. *Journal of Heredity* **106(1)**: 93-101.

Hmeljevski KV, Wolowski M, Forzza RC, Freitas L. 2017. High outcrossing rates and short-distance pollination in a species restricted to granitic inselbergs. *Australian Journal of Botany* **65(4)**: 315-326.

Hopper SD. 2009. OCBIL theory: towards an integrated understanding of the evolution, ecology and conservation of biodiversity on old, climatically-buffered, infertile landscapes. *Plant and Soil* **322**: 49-86.

Hopper SD, Silveira FAO, Fiedler PL. 2016. Biodiversity hotspots and Ocbil theory. *Plant and Soil* **403**: 167-216.

Jacques SSA. 2015. Revisão taxonômica do complexo *Billbergia amoena* (Lodd.) Lindl. (Bromeliaceae, Bromelioideae). Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Jaques-Felix H. 2000. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana* **21**:118-124.

Katzir Y, Matthews A, Garfunkel Z, Schliestedt M, Avigad D. 1996. The tectono metamorphic evolution of a dismembered ophiolite (Tinos, Cyclades, Greece). *Geological Magazine* **133**: 237-254.

Kölliker R, Jones ES, Drayton MC, Dupal MP, Forster JW. 2001. Desenvolvimento e caracterização de marcadores de repetição de sequência simples (SSR) para trevo branco (*Trifolium repens* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 416-424.

- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, Weising K. 2014.** Phylogeny and Evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematics and Evolution* **300**: 1591-1614.
- Kuntz KL, Larson DW. 2006.** Influences of microhabitat constraints and rockclimbing disturbance on cliff-face vegetation communities. *Conservation Biology* **20(3)**: 821-832.
- Larson DW, Matthes U, Kelly PE. 2000.** Cliff ecology: pattern and process in cliff ecosystems. *Cambridge Studies in Ecology*. 340p.
- Lavania UC. 2020.** Plant speciation and polyploidy: in habitat divergence and environmental perspective. *Nucleus* **63**: 1-5.
- Lavor P, Van Den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM. 2014.** Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the iron quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* **101(7)**: 1-9.
- Leme EMC, Brown GK. 2004.** Four new lithophytic *Vriesea* species (Tillandsioideae) from Southeastern Brazil. *Vidalia* **2(1)**: 3-11.
- Leme EMC, Fraga CN, Kollmann LJC, Brown GK, Till W, Ribeiro OBC, Machado MC, Monteiro FJS, Fontana AP. 2010.** Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. *Rodriguésia* **61(1)**: 021-067.
- Leme EMC. 2012.** Revision of the Lithophytic *Vriesea* Species from Minas Gerais, Brazil - Part V: Two tubolaciniate stigma-type new species. *Journal of the Bromeliad Society* **62(1)**: 10-19.
- Leme EMC, Till W, Kollmann LJC, Moura RL, Ribeiro OBC. 2014.** Miscellaneous new species of Brazilian Bromeliaceae – III. *Phytotaxa* **177(2)**: 061-100.

- Lexer C, Marthaler F, Humbert S, Barbará T, Harpe ML, Bossolini E, Paris M, Martinelli G, Versieux L. 2016.** Gene flow and diversification in a species complex of *Alcantarea* inselberg bromeliads. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 505-520.
- Litt M, Luty JA. 1989.** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* **44**: 397-401.
- Louzada RB, Palma-Silva C, Corrêa AM, Kaltchuk-Santos E, Wanderley MGL. 2010.** Chromosome number of *Orthophytum* species (Bromeliaceae). *Kew Bull* **65**: 53-58.
- Manhães VC, Couto DR, Miranda FD, Carrijo TT. 2016.** New findings on the distribution of *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), a species restricted to Atlantic Forest inselbergs. *Phytotaxa* **245(1)**: 59-65.
- Manhães VC, Miranda FD, Clarindo WR, Carrijo TT. 2019.** Genetic diversity and karyotype of *Pitcairnia azouryi*: an endangered species of Bromeliaceae endemic to Atlantic Forest inselbergs. *Molecular Biology Reports* **47**: 179-189.
- Marchant CJ. 1967.** Chromosome evolution in the Bromeliaceae. *Kew Bull* **21**:161-168.
- Martinelli G. 2007.** Mountain biodiversity in Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **30(4)**: 587-597.
- Martinelli G, Magalhães CV, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC. 2008.** Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* **59(1)**: 209-258.
- Martinelli G, Moraes MA. 2013.** Livro vermelho da flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.

- Marques AR, Lemos Filho JP, Mota RC. 2012.** Diversity and conservation status of bromeliads from Serra da Piedade, Minas Gerais, Brazil. *Rodriguésia* **63**: 243-255.
- Miranda FD, Gontijo ABPL, Santiliano FC, Favoreto FC, Soares TCB. 2012.** Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae. *Biota Neotropica* **12(3)**: 319-323.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J, Fonseca GAB. 2004.** Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX & Agrupación Sierra Madre, Mexico City, Mexico.
- Moon HS, Nicholson JS, Lewis RS. 2008.** Uso de marcadores de microssatélites *Nicotiana tabacum* L. transferíveis para investigar a diversidade genética no gênero *Nicotiana*. *Genoma* **51**: 547-559.
- Mota MR, Pinheiro F, Leal BSS, Wendt T, Palma-Silva C. 2019.** The role of hybridization and introgression in maintaining species integrity and cohesion in naturally isolated inselberg Bromeliads populations. *Plant Biology* **21**: 122-132.
- Moura MN, Forzza RC, Cristiano MP. 2018.** Reconstruction of ancestral genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae): what can genome size tell us about the evolutionary history of its five genera? *Botanical Journal of the Linnean Society* **186**: 321-333.
- Müller LB, Zotz G, Albach DC. 2019.** Bromeliaceae subfamilies show divergent trends of genome size evolution. *Scientific Reports* **9**: 5136.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca, GAB, Kent J. 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.

- Naczi RFC, Reznicek AA, Ford BA. 1998.** Morphological, geographical and ecological differentiation in the *Carex willdenowii* complex (Cyperaceae). *American Journal of Botany* **85**: 434-447.
- Nagy I, Stágel A, Sasvári Z, Röder M, Ganal M. 2007.** Desenvolvimento, caracterização e transferibilidade para outras Solanáceas de marcadores microssatélites em pimenta (*Capsicum annuum* L.). *Genoma* **50**: 668-688.
- Neri J, Nazareno AG, Wendt T, Palma-Silva C. 2015.** Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **58**: 34-37.
- Neves B, Uribbe FP, Jacques SSA, Zanella CM, Costa AF. 2018.** Species boundaries in the *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae) complex after a broad morphometric and taxonomic study. *Systematic Botany* **43(4)**: 870-888.
- Newmaster SG, Balasubramaniam V, Murugesan M, Ragupathy S. 2008.** *Tripogon cope* (Poaceae: Chloridoideae), a new species supported by morphometric analysis and a synopsis of *Tripogon* in India. *Systematic Botany* **33(4)**: 695-701.
- Nielsen LR, Cowan RS, Siegismund HR, Adersen H, Philipp M, Fay MF. 2003.** Morphometric, AFLP and plastid microsatellite variation in populations of *Scalesia divisa* and *S. incisa* (Asteraceae) from the Galapagos Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society* **143**: 243-254.
- Nunes ACP, Nogueira EU, Gontijo ABPL, Carvalho CR, Clarindo WR. 2013.** The first karyogram of a Bromeliaceae species: an allopolyploid genome. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1135-1140.
- Nunes ACP, Clarindo WR. 2014.** Karyotype characterization and nuclear DNA content measurement in Bromeliaceae: State of the art and future perspectives. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **86(4)**: 1849-1861.

- Paixão-Souza B. 2012.** Revisão Taxônomica do Complexo *Tillandsia streptocarpa* Baker. (Tillandsioideae, Bromeliaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- Padial J M, Miralles A, De la Riva I, Vences M. 2010.** The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology* **7(1)**: 16.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C. 2008.** Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Resources* **8**: 980-982
- Palma-Silva C, Santos DG, Kaltchuk-Santos E, Bodanese-Zanettini MH. 2004** Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. *American Journal of Botany* **91**: 804-807.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2009.** Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* **103**: 503-512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay M F, Cozzolino S, Lexer C. 2011.** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* **20**: 3185-3201.
- Paule J, Wagner ND, Weising K, Zizka G. 2017.** Ecological range shift in the polyploid members of the South American genus *Fosterella* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* **120(2)**: 233-243.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A. 1998.** Cross-species amplification of soybean (*Glucine max*) simple sequence repeats (SSRs) within

the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* **15(10)**:1275-1287.

Peres-Neto PR. 1995. Introdução a análises morfométricas. *Oecologia Brasiliensis* **2**:57-89.

Petit RJ, Excoffier L. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution* **24(7)**: 386-393.

Porembski S, Martinelli G, Ohlemüller R, Barthlott W. 1998. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Diversity and Distributions* **4**: 107-119.

Porembski S, Barthlott W. 2000. Inselbergs: biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. *Ecological studies* 146. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag.

Porembski S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 579-586.

Porembski S, Silveira FAO, Fiedler PL, Watve A, Rabarimanarivo M, Kouame F, Hopper SD. 2016. Worldwide destruction of inselbergs and related rock outcrops threatens a unique ecosystem. *Biodiversity and Conservation* **25**: 2827-2830.

Provan J, Powell W, Waugh W. 1996. Análise por microssatélites de relacionamentos no tomate cultivado (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 1078-1084.

Ramírez-Morillo IM, Brown GK. 2001. The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Systematic Botany* **26**: 722-726.

- Ribeiro DB, Freitas AVL. 2010.** Differences in thermal responses in a fragmented landscape: Temperature affects the sampling of diurnal, but not nocturnal fruit-feeding Lepidoptera. *The Journal of Research on the Lepidoptera* **42**: 1-4.
- Ricklefs RE. 2003.** A economia da natureza. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW. 1995.** Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics* **246**: 327-333.
- Safford HD, Martinelli G. 2000.** Southeast Brazil. In: Porembski S. & Barthlott W. (eds). *Inselbergs - biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions*, vol. 146. Berlin: Ecological Studies, Springer-Verlag, 339389.
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J, Samadi S. 2003.** Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes* **3**: 221-223.
- Sites JW, Marshall JC. 2003.** Delimiting species: A renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 462-470.
- Sites JW, Marshall JC. 2004.** Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**: 199-277.
- Sgorbati S, Labra M, Grugni E, Barcaccia G, Galasso G, Boni U, Mucciarelli M, Citterio S, Irama'tegui AB, Gonzales LV, Scannerini S. 2004.** A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biology* **6**: 222–230.
- Small E, Fawzy M. 1992.** Morphogeographic variation in the *Medicago monantha* complex. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1292–1301.

- Smith LB, Downs R. 1974.** Flora Neotropica, Monograph No.14, Part 1, Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Hafner Press*, New York. p.1-658.
- Smith LB, Downs R. 1977.** Bromeliaceae, sub-family Tillandsioideae. Flora Neotropica, *Hafner Press*, New York, mon. **14(2)**: 663-1492.
- Smith LB, Downs R. 1979.** Bromeliaceae, sub-family Bromelioideae. Flora Neotropica, The New York Botanical Garden, New York, mon. 14, part 3, p. 1493-2142.
- Studlar SM, Fuselier L, Clark P. 2015.** Tenacity of Bryophytes and Lichens on Sandstone cliffs in west Virginia and relevance to recreational climbing impacts. *Evansia* **32(3)**: 121-135.
- Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A. 2003.** Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 411-422.
- Trovó M, Sano PT, Winkworth R. 2008.** Morphology and environment: geographic distribution, ecological disjunction, and morphological variation in *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano (Eriocaulaceae). *Feddes Repertorium* **119(7-8)**: 634–643.
- Tomlinson PB. 1969.** Commelinales-Zingiberales. In: C. R. Metcalf (ed.) *Anatomy of the monocotyledons*. Clarendon Press, Oxford, pp. 193-294.
- Tumi L, Zhang Y, Wang Z, Suni ML, Burgess KS, Ge X. 2019.** Microsatellite markers for the endangered *Puya raimondii* in Peru. *Applications in Plant Sciences*. **7(12)**: e11308.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C. 2013.** Phylogeographic patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* **22**: 1193-1213.
- Uribe FP, Neves B, Jacques SSA, Costa, AF. 2020.** Morphological variation in the *Vriesea procera* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) in the Brazilian

Atlantic Rainforest, with recognition of new taxa. *Systematic Botany* **45(1)**: 53-68.

Van Der Niet T, Johnson SD, Linder HP. 2006. Macroevolutionary data suggest a role for reinforcement in pollination system shifts. *Evolution* **60**: 1596-1601.

Varajão CAC, Alkmim FF. 2015. Pancas: The kingdom of bornhardts. In Vieira, B.C.; Salgado, A.A.R. & Santos, L.J.C. (Eds.) Landscapes and landforms of Brazil (p. 381-388). World geomorphological landscapes. Dordrecht: Springer Science+Business Media.

Versieux LM, Wendt T. 2006. Checklist of Bromeliaceae of Minas Gerais, Brazil, with notes on taxonomy and endemism. *Selbyana* **27**: 107-146.

Versieux LM, Elbl PM, Wanderley MGL, Menezes NLD. 2010a. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. *Nordic Journal of Botany* **28**: 385-397.

Wendt T, Canela MBF, Morrey-Jones JE, Henriques AB, Rios RI. 2000. Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. *Systematic Botany* **25**: 389-398.

Wendt T, Coser TS, Matallana G, Guilherme FAG. 2008. An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **275**: 31-41.

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

Yu F, Wang BH, Feng SP, Wang JY, Li WG, Wu YT. 2011. Development, characterization, and cross-species/genera transferability of SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell Reports* **30(3)**: 335-344.

- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F. 2011.** Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **98**: 1511-1519.
- Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F. 2012.** Genetics, Evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*. **35(4)**: 1020-1026.
- Zenk FL, Firmer C, Wöhrmann T, Silva LV, Weising K, Huettel B, Paggi GM. 2018.** Development of 15 nuclear microsatellite markers in *Deuterocohnia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Applications in Plant Sciences* **6**:1-7.
- Zizka A, Azevedo J, Leme E, Neves B, Costa AF, Caceres D, Zizka G. 2020.** Biogeography and conservation status of the pineapple Family (Bromeliaceae). *Diversity and Distributions* **26**: 183-195.

Capítulo 1

Transferability of nuclear microsatellite markers to *Stigmatodon* species: bromeliad genus endemic to vertical cliffs of inselbergs in Brazil

Artigo publicado no periódico Brazilian Journal of Botany



Transferability of nuclear microsatellite markers to *Stigmatodon* species: a bromeliad genus endemic to vertical cliffs of inselbergs in Brazil

Vitor Cunha Manhães¹ · Dayvid Rodrigues Couto¹ · Fabiano Salgueiro² · Andrea Ferreira da Costa³

Received: 16 June 2020 / Revised: 24 August 2020 / Accepted: 31 August 2020
© Botanical Society of Sao Paulo 2020

Abstract

Stigmatodon Leme, G.K.Br. & Barfuss is one of the most representative Bromeliaceae genera that grow on the steepest slopes of the inselbergs of southeastern Brazil. Inselberg environments are characterized as islands due to their restricted, disjunct distribution and geographical isolation. These features make these sites interesting models for evolutionary and population genetic studies. In this study we report, the cross-species transferability of nuclear microsatellite markers, originally developed for other Bromeliaceae, to four *Stigmatodon* species: *Stigmatodon brassicoides*, *S. costae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon* sp. nov. Twenty-four microsatellite markers were tested, and 12 of these were successfully amplified in the four studied species. In *S. brassicoides* and *S. costae*, 10 markers showed amplification with polymorphism, and in *Stigmatodon* sp. nov. and *S. goniorachis*, all 12 markers showed polymorphisms. The number of alleles ranged from two to four in *S. brassicoides*; from two to three in *S. costae*; from two to six in *Stigmatodon* sp. nov.; and from two to seven in *S. goniorachis*. H_O values ranged from 0.05 (P2P19 locus) in *S. brassicoides* to 0.689 (VgA04 locus) in *S. goniorachis*. The set of amplified microsatellite markers described in this study will be a useful tool for addressing various evolutionary, ecological and conservation aspects of *Stigmatodon* species.

Keywords Atlantic Forest · Bromeliaceae · Cross-amplification · SSR · Tillandsioideae

1 Introduction

Stigmatodon Leme, G.K.Br. & Barfuss belongs to the Tillandsioideae subfamily and was recently segregated from *Vriesea* Lindl. (Barfuss et al. 2016). *Stigmatodon* probably arose in the Brazilian Atlantic Forest c. 2.8–6.4 Mya (Kessous et al. 2019). Today, it is endemic to this biome and

comprises 19 species that exclusively inhabit the vertical slopes of inselbergs in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil (Couto and Costa 2019).

Recent studies revealed four species of the genus that have very similar morphological characteristics (Couto 2017). These species occur exclusively on coastal inselbergs of the metropolitan region of Rio de Janeiro: *Stigmatodon brassicoides* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss; *S. costae* (B.R.Silva & Leme) Leme, G.K.Br. & Barfuss; *S. goniorachis* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss; and *Stigmatodon* sp. nov., which share morphological affinity with *S. goniorachis* (Fig. 1). These taxa can be differentiated by leaf posture, color and indument, and the shape and color of the floral bracts. The four species do not occur in sympatry, but instead occupy a set of coastal inselbergs of Rio de Janeiro, with a maximum distance of 40 km between them. Species that occur exclusively in these environments usually have a high degree of isolation. For this reason, they are considered excellent models for studies of evolutionary processes such as genetic diversity and gene flow among species and populations (Barbará et al. 2007a, 2009) that are directly linked to

✉ Vitor Cunha Manhães
manhaesvc@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, Rio de Janeiro, RJ 20949-040, Brazil

² Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Av. Pasteur 458, Rio de Janeiro 22290-255, Brazil

³ Departamento de Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, Rio de Janeiro 20949-040, Brazil

Fig. 1 Species analyzed in this study. **a, b** *S. brassicoides*, **c, d** *S. costae*, **e, f** *Stigmatodon* sp. nov., **g, h** *S. goniorachis*. (Images: V.C. Manhães and P. Tristram)



the adaptation, evolution and survival of species, especially on environmental changes (Caballero et al. 2010).

Microsatellite (SSR) markers are widely used to study and understand these processes because of their high variability, broad genome coverage and codominant inheritance (Powell et al. 1996; Varshney et al. 2005). However, the development of species-specific SSR primers can be costly,

making multi-species use of such markers economically uninteresting. Transferability assessment can be a feasible low-cost alternative. This technique involves primers originally developed for a particular taxon being used in DNA samples from a related species. The evolutionary proximity between the two species commonly allows the successful use of the pair of primers (Barbará et al. 2007a).

Here, we report the efficiency of heterologous amplification in four species of the *Stigmatodon* genus, using nuclear microsatellite markers originally developed for other Bromeliaceae species. We aimed to describe tools for diversity analysis and population genetic structure studies in these endemic Atlantic Forest inselberg species.

2 Materials and methods

Species under study and sampling – Microsatellites were cross-species transferred to *Stigmatodon brassicoides*, *S. costae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon* sp. nov. Leaf samples from 24 individuals representing the four species were collected at four locations (georeferenced by GPS) in the cities of Niterói and Rio de Janeiro, Rio de Janeiro state, Brazil. The samples were stored in silica gel for DNA extraction and purification (Table 1). One copy of each species was collected and then deposited at the National Museum (R) Herbarium.

DNA extraction and amplification – DNA extraction and purification were performed according to the protocol described by Doyle & Doyle (1990) with the modifications implemented by Margis et al. (2002). DNA concentration was estimated by electrophoresis, using 1.0% agarose gels (w/v) prepared in 0.5X TAE buffer (Tris–acetate–EDTA), comparing band patterns to Lambda DNA standards (25, 50 and 100 ng). Samples were stained with GelRed® and visualized and photographed under ultraviolet light using a photo-documentation system. We tested the amplification of 24 pairs of primers of nuclear microsatellite markers previously developed for other bromeliad species: Ac40, Ac25 (Goetze et al. 2013); Ai4.11, Ai4.10, Ai4.03, Ai5.18, VgA06, VgC01, VgG03, VgG02, VgF01, VgF02, VgB10, VgA04 (Palma-Silva et al. 2006); Pa10, PaZ01 (Paggi et al. 2008); Pit5, Pit8 (Sarhou et al. 2003); e6, e19, p2p19, CT5 (Boneh et al. 2003); Fos03 (Wöhrmann et al. 2012); and ACPTC138A (Kinsuat and Kumar 2007) (Table 2).

The amplification of the locus was performed by polymerase chain reaction in a thermal cycler (Biocycler). Each 25 µL of amplification reaction mixture contained 1 unit

(U) of Taq DNA polymerase (Thermo Scientific Inc, USA); 1 × reaction buffer with NH₄SO₄; 2.0 mM MgCl₂; 0.16 mM dNTPs; 8 pmol of reverse primer; 2 pmol of forward primer; 0.025 mg of bovine serum albumin (BSA); and 10 ng of total genomic DNA.

The amplification method adopted in this study was based on the use of primers complexed with fluorophore molecules, as described by Schuelke (2000). In each reaction, we used a forward primer with an M13 extension ("tail"), 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3', an unmodified reverse primer and a fluorophore-labeled primer complementary to the M13 extension. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed first according to the following program: 95 °C for 5 min; 10 cycles of 95 °C for 15 s, touchdown from 55 to 45 °C for 15 s, and 95 °C for 15 s; and 20 cycles of 95 °C for 15 s, 45 °C for 15 s and 72 °C for 15 s. Next, each sample was supplemented with 8 pmol of each fluorophore-labeled primer (complementary to the M13 "tail") and then run through the following cycles: 95 °C for 15 s, 8 cycles of 53 °C for 15 s and 72 °C for 30 s; and a final extension phase at 72 °C for 30 min. The fluorescent markers used in the method were 6-FAM™, VIC®, NED™ and PET®, constituents of the DS-33™ Dye Set (Applied Biosystems). Then, samples were sent to MACROGEN® company to be genotyped.

The amplified fragments were separated by electrophoresis on 2.0% (w/v) agarose gel stained with GelRed in 0.5X TAE buffer at 100 Volts for approximately 1 h. After the run, the gels were photographed under ultraviolet light and analyzed for the number and molecular weight of the amplified fragments.

Data analysis – Genotyping results were manually analyzed using the luminescence peaks depicted in the graphs, viewed using the PeakScanner2 program (Applied Biosystems). The presence of a pronounced peak indicates homozygosity, and the presence of two peaks means heterozygosity. Alleles were recorded according to the size of each fragment, and genotyping errors and null alleles were detected using Microchecker v2.2.3 software (Van Oosterhout et al. 2004).

Genetic variability analyses were performed using the genotypes obtained for the four *Stigmatodon* species

Table 1 Sampled populations of the four species under study, with their locations and geographical parameters

Species	Number of samples	Location	Coordinates	Altitude (m)
<i>S. brassicoides</i>	3	Pedra da Gávea, Rio de Janeiro-RJ	22° 59' 53" S 43° 17' 42" W	660
<i>S. costae</i>	7	Morro do Tucum, Niterói-RJ	22° 58' 25" S 43° 01' 36" W	79
<i>S. goniorachis</i>	7	Pão de Açúcar, Rio de Janeiro-RJ	22° 57' 02" S 43° 09' 16" W	106
<i>Stigmatodon</i> sp. nov.	7	Pedra Hime, Rio de Janeiro-RJ	22° 55' 50" S 43° 24' 46" W	270

Table 2 Microsatellite locus used in heterologous amplification tests, including the name of the species for which the marker was originally developed, the name of the locus, the primer sequence, the microsatellite motif and the size of the fragment detected in the original species

Species name	Locus	Primer sequence (5'-3')	SSR motif	Size range	References
<i>Aechmea caudata</i>	Ac40	F: GCAGCACCAGAGACA GCA R: GTGGGAGAGTGTGGA GAGGT	(AG) ₁₈	188–202	Goetze et al. (2013)
<i>Aechmea caudata</i>	Ac25	F: ATACTGCCCTCCATT TCCAC R: GCTGATCTCAAAC CGAGCA	(CA) ₉	170–180	Goetze et al. (2013)
<i>Alcantarea imperialis</i>	Ai4.11	F: GAGGAATCACCGAAT CCTGA R: TTGAGCGGCTCTCTC TCT	(GTTTGA) ₂ (AG) ₅ (AG) ₁₃	290–320	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Alcantarea imperialis</i>	Ai4.10	F: CCCCTCGATAATATTG ATCTACACT R: TAAACAGAAGCAGGG GGAAA	(AT) ₅ (CATG) ₅	184–188	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Alcantarea imperialis</i>	Ai4.03	F: TGGCTTGTGGAGTTC TCACT R: AACAAGGAGGTTGAT CAAGAGG	(AT) ₅ (GA) ₅ (TC) ₄ (TA) ₅	191–195	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Alcantarea imperialis</i>	Ai5.18	F: CACCATCTCAGTTAA AGGCATT R: TGCTCCTTAAATCCA GCTAAATG	(GTTTGA) ₂ (AG) ₅ (AG) ₁₃	290–320	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Ananas comosus</i>	ACPCT138A	F: GACGAGGACCGTACT CACGA R: ATGGCATGATCTCGT CCACT	(CTT) ₄ ... (AAG) ₃	161	Kinsuat and Kumar (2007)
<i>Fosterella rusbyi</i>	Fos03	F: TCACGATAGGAGTAC AAAAGG R: CGCAAATAATGAAAA TTAGACC	(TAA) ₁₁	139	Wöhrmann et al. (2012)
<i>Pitcairnia albiflos</i>	PaA10	F: AACCATTGACATCCG CTGTT R: CTTCGGAAGCTCCTC TGGAT	(ATG) ₁₀	146–149	Paggi et al. (2008)
<i>Pitcairnia albiflos</i>	PaZ01	F: TGACCAGATAGCACC ATCCA R: TTGAGTGTGGAGCC CACTT	(AG) ₂₀	185–199	Paggi et al. (2008)
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	Pit8	F: GAGGATGAAGGATTT CCAAGG R: ACCGTCCCACGATAA GAGC	(CCTCT) ₅ (TC) ₃ (TGC) ₁₁		Sarhou et al. (2003)
<i>Pitcairnia albiflos</i>	Pit5	F: TTGAGCCATGAACAA TAGGG R: AGAATTCTAGTGGCA GTCCTC	(GA) ₂₀		Sarhou et al. (2003)
<i>Tillandsia fasciculata/Guzmania monostachia</i>	CT5	F: AATGAGTTTCAGTTT TAGAAGC R: CCAAGAAAAGAACGG ATCA	GA ₍₂₅₎	189	Boneh et al. (2003)

Table 2 (continued)

Species name	Locus	Primer sequence (5'-3')	SSR motif	Size range	References
<i>Tillandsia fasciculata</i> / <i>Guzmania monostachia</i>	p2p19	F: ATGCTGCCCACTGAA GATT R: TCCGTCCAAGGTTTA TTGC	GAA ₍₁₃₎	204	Boneh et al. (2003)
<i>Tillandsia fasciculata</i> / <i>Guzmania monostachia</i>	e19	F: TCTTACTGCTCTCCA TTGGT R: ATTTTTGGTGTGCA GATGT	CT ₍₁₅₎	137	Boneh et al. (2003)
<i>Tillandsia fasciculata</i> / <i>Guzmania monostachia</i>	e6	F: AAACATATGGATTCCC CAACT R: CGGTTCCCTCCTTAGT CTTT	CAA ₍₁₄₎	148	Boneh et al. (2003)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgA06	F: GGGAAAAGCTCGATA AGGTG R: GCTACGGCTCAACAT TCCAT	(CT) ₁₀	223–253	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgG03	F: GCAAGGCAATTTCTT GTGCT R: AGGCGCAACTTACAG GAAAA	(AT) ₆ (GT) ₈	209–213	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgG02	F: GAAGGCCCATCTTTG TTTGA R: AATGCCAAAGTCGGT GACTC	(CT) ₁₄	241–259	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgF02	F: TTACACCTGCCTACC CCTTG R: TTGGAGATCAAAACC CGAAG	(CT) ₁₂ (CT) ₁₇	176–204	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgF01	F: CATGCTCTCCTCCTT CTTGG R: TTGGGTTTCATTCCTG AAAGG	(CT) ₁₇	154–199	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgC01	F: GCTAGGGTTTCACCC CAAAT R: TCAGCCTCTGATCCA TCTCC	(CT) ₁₆	208–218	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgB10	F: CGGGGGTGTATAGGT AGCAA R: GCCGTTTTGAAAAGCT CCAT	(AG) ₂₄	119–156	Palma-Silva et al. (2006)
<i>Vriesea gigantea</i>	VgA04	F: CAAACCTTCTCACC TCACC R: CGACTCACCTGGCCC TAAT	(TC) ₆ (CT) ₁₁ (TC) ₁₆	187–215	Palma-Silva et al. (2006)

evaluated in this study. The number of alleles per locus (A) and the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity under the Hardy–Weinberg equilibrium were estimated using Arlequin v3.1 program (Excoffier et al. 2007).

3 Results and discussion

Of the 24 pairs of primers of microsatellite markers tested in the present study, 12 (50%) showed positive

amplification. Of these, nine locus (ACPTC138A, A14.03, e6, Pit8, VgA04, VgC01, VgG02, VgF02 and VgB10) were successfully amplified in all four taxa, and three locus (CT5, Fos03 and P2P19) were successfully amplified in at least two of the four species analyzed (Table 3).

In *S. goniorachis* and *Stigmatodon* sp. nov., all analyzed locus showed polymorphism. In *S. brassicoides* and *S. costae*, 10 of the 12 amplified microsatellite locus (83.3%) showed polymorphism. In *S. costae*, the number of alleles ranged from one to three, and H_E and H_O values were 0.233–0.617 and 0.221–0.597, respectively. In *Stigmatodon* sp. nov., the number of alleles ranged from two to six, $H_E = 0.130$ –0.680 and $H_O = 0.080$ –0.650. In *S. brassicoides*, the number of alleles ranged from one to four, $H_E = 0.160$ –0.512 and $H_O = 0.050$ –0.523. And in *S. goniorachis*, the number of alleles ranged from two to seven, $H_E = 0.213$ –0.701 and $H_O = 0.199$ –0.689 (Table 3).

The observed and expected heterozygosity values in the present study are similar to those reported for other Bromeliaceae species of the same subfamily: the genus *Vriesea*, with $H_O = 0.131$ –0.424 and $H_E = 0.467$ –0.714 (Palma-Silva et al. 2009; Lavor et al. 2014; Cacossi et al. 2019); *Alcantarea* species, with $H_O = 0.257$ –0.362 and $H_E = 0.429$ –0.615 (Barbará et al. 2007b); and *Tillandsia* species, with $H_O = 0.068$ –0.662 and $H_E = 0.629$ –0.859 (Chaves et al. 2018). Other subfamilies also show similar values: *Pitcairnia* species, with $H_O = 0.293$ –0.472 and $H_E = 0.325$ –0.663 (Paggi et al. 2008; Boisselier-Dubayle et al. 2010; Miranda et al. 2012; Manhães et al. 2019); species of the genus *Aechmea*, with $H_O = 0.470$ –0.530 and $H_E = 0.480$ –0.624 (Miranda et al. 2012; Godoy et al. 2019); and the genus *Bromelia* in *B. antiacantha* Bertol., with $H_O = 0.369$ and $H_E = 0.746$ (Zanella et al. 2011).

The success rate in the transfer of markers between monocotyledon species of the same genus is around 40% (Barbará et al. 2007a). Accordingly, the level of transferability obtained for the species studied here can be considered above average, since 12 of the 24 pairs of primers tested (50%) yielded positive results. Similarly successful results in marker transfer have also been reported for other species of Bromeliaceae (Barbará et al. 2007a; Paggi et al. 2008; Palma-Silva et al. 2009, 2011; Wöhrmann and Weising 2011; Zanella et al. 2012; Goetze et al. 2013; Lavor et al. 2014; Neri et al. 2015; Ferreira et al. 2017; Pereira et al. 2017; Chaves et al. 2018; Godoy et al. 2018, 2019; Zenk et al. 2018). High transferability between species of the same Bromeliaceae subfamily is probably due to the family's large adaptive radiation, leading to low levels of divergence in their DNA sequences (see Palma-Silva et al. 2006; Barbará et al. 2007b).

The species of the genus *Stigmatodon* constitute an interesting biological model for the study of the evolution of plants, as they have high endemism, and with restricted and

Table 3 Characterization of the 12 nuclear microsatellite markers transferred to *S. brassicoides*, *S. costae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon* sp. nov. species

Species (no. samples)	Locus	ACPTC138A	A14.03	CT5	e6	Fos03	Pit8	P2P19	VgA04	VgC01	VgG02	VgF02	VgB10
<i>S. brassicoides</i> (3)	Size range	195–203	196–222	179	133–139	107	276–282	197–203	210–220	231–241	245–253	161–167	147–165
	N°alleles	2	2	1	2	1	2	2	4	2	2	3	3
	H_O	0.126	0.25	–	0.211	–	0.314	0.05	0.46	0.399	0.399	0.523	0.244
<i>S. costae</i> (7)	H_E	0.324	0.279	–	0.215	–	0.35	0.16	0.42	0.411	0.455	0.512	0.299
	Size range	195–203	196–222	179	133–139	103–107	282–288	203	212–220	219–229	239–243	153–159	147–153
	N°alleles	2	2	1	2	2	2	1	3	2	3	2	3
<i>S. goniorachis</i> (7)	H_O	0.329	0.221	–	0.313	0.466	0.525	–	0.597	0.403	0.476	0.503	0.222
	H_E	0.409	0.233	–	0.393	0.456	0.499	–	0.617	0.415	0.436	0.544	0.455
	Size range	195–209	204–224	179–203	133–139	107–109	276–294	199–203	208–218	221–231	239–281	155–169	149–153
<i>Stigmatodon</i> sp. nov. (7)	N°alleles	5	4	5	2	2	4	2	5	3	7	5	3
	H_O	0.45	0.678	0.266	0.243	0.199	0.433	0.277	0.689	0.356	0.678	0.573	0.355
	H_E	0.57	0.699	0.311	0.25	0.213	0.488	0.289	0.701	0.322	0.69	0.533	0.311
<i>Stigmatodon</i> sp. nov. (7)	Size range	195–207	220–222	193–199	133–139	103–107	282–294	197–203	208–220	219–231	275–285	155–165	151–159
	N°alleles	5	2	3	2	2	3	2	6	3	4	4	3
	H_O	0.41	0.366	0.422	0.09	0.186	0.08	0.177	0.65	0.323	0.432	0.355	0.256
	H_E	0.413	0.436	0.46	0.23	0.213	0.13	0.241	0.68	0.333	0.455	0.389	0.276

disjunct geographical distribution in steepest slopes of the inselbergs of Brazil (Couto 2017). Some of these taxa meet IUCN criteria for some degree of extinction risk, such as *S. brassicoides* and *S. costae*, inserted in the Red Book of Flora of Brazil (Martinelli and Moraes 2013). Hoban et al. (2020) state the importance of including in global conservation policy (e.g., CDB—Convention on Biological Diversity) targets and indicators for genetic diversity for all species, and not just for domesticated species. The present study's results of the microsatellite marker transfer can contribute significantly to research about the levels and patterns of genetic diversity of *Stigmatodon* species, contributing for understanding the adaptive, evolutionary and survival rates of these taxa, and to the establishment of effective conservation strategies. Furthermore, as Noor and Feder (2006) highlighted, cross-amplification of SSR markers allows comparative studies between close and/or related species and improves our understanding about the mechanisms of speciation and population genetic divergence.

Acknowledgements The study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—Finance Code 001, with the PhD grants awarded to DRC and VCM, and CAPES-PROTAX-II to VCM; by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), through an AFC research productivity grant (process #305704/2018-4); and by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), with research grants (process#E-26/200.073/2019-BOLSA) to AFC.

Author's contribution VCM and FS designed the study. VCM, DRC and FS performed the experiments and analyzed the data. All authors wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest There is not conflict of interest.

References

- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007a) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol Ecol* 16:1981–1992
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007b) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16:3759–3767
- Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S, Lexer C (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glazouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 103:65–77
- Barfuss MHJ, Tüll W, Leme EMC, Pizón JP, Manzanares JM, Halbeither H, Samuel R, Murrom GK (2016) Taxonomic revision of the subfamily Bromeliaceae. Tillandsioideae based on a phylogeny and multi-locus DNA sequence morphology. *Phytotaxa* 279:001–097
- Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdiere J, Sarthou C (2010) Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana: a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography* 33:175–184
- Boneli L, Kuperus P, Van Tienderen PH (2003) Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachia*. *Mol Ecol Notes* 3:302–303
- Caballero A, Rodríguez-Ramilo ST, Ávila V, Fernández J (2010) Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. *Conserv Genet* 11:409–419
- Cacossi T, Dantas-Queiroz MV, Palma-Silva C (2019) Transferability of nuclear microsatellite markers to *Vriesea oligantha* (Bromeliaceae), an endemic species from Espinhaço Range, Brazil. *Braz J Bot* 42:727–733
- Chaves JNC, Aoki-Gonçalves F, Leal BSS, Rossatto DR, Palma-Silva C (2018) Transferability of nuclear microsatellite markers to the atmospheric bromeliads *Tillandsia recurvata* and *T. aeranthis* (Bromeliaceae). *Braz J Bot* 41:931–935
- Couto DR (2017) Taxonomic review and phylogeny of *Stigmatodon* Leme, G.K BR. and Barfuss (Bromeliaceae - Tillandsioideae). Doctoral dissertation, Federal University of Rio de Janeiro, National Museum
- Couto DR, Costa AF (2019) *Stigmatodon* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/refflor/floradobrasil/FB603948>. Acesso em: 22 Ago. 2019
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
- Ferreira MCF, Neri J, Palma-Silva C, Pinangé S, Benko-Iseppon AM, Louzada RB (2017) Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in two species of *Cryptanthus* Otto and A. Dietr. (Bromeliaceae). *Braz J Bot* 40:475–480
- Godoy FMR, Lenzi M, Ferreira BHS, Silva LV, Zanella CM, Paggi GM (2018) High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 187:672–688
- Godoy FMR, Paggi GM, Palma-Silva C (2019) Cross-amplifications of nuclear microsatellite markers in *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae). *Braz J Bot* 42:353–359
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LS, Bered F, Palma-Silva C (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochem Syst Ecol* 48:194–198
- Hoban S, Bruford M, Jackson FD, Lopes-Fernandes M, Heuertz M, Hohenlohe PA, Paz-Vinas I, Sjögren-Gulve P, Segelbacher G, Vernesi C, Aitken S, Bertola LD, Bloomer P, Raça M, Rodríguez-Cornea H, Funk WC, Grueber CE, Hunter ME, Jaffe R, Liggins L, Mergeay J, Moharrek F, O'Brien D, Ogden R, Palma-Silva C, Pierson J, Ramakrishnan U, Simo-Droissart M, Tani N, Waits L, Laikre L (2020) Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biol Conserv* 248:108654
- Kessous IM, Neves B, Couto DR, Paixão-Souza B, Pederneiras LC, Moura RL, Barfuss MHJ, Salgueiro F, Costa AF (2019) Historical biogeography of a Brazilian lineage of Tillandsioideae (subtribe Vrieseinae, Bromeliaceae): the Paranaean Sea hypothesized as the main vicariant event. *Bot J Linn Soc* 192:625–641
- Kinsuat MJ, Kumar SV (2007) Polymorphic microsatellite and cryptic simple repeat sequence markers in pineapples (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Mol Ecol Notes* 7:1032–1035
- Lavor P, Van Den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM (2014) Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea*

- minarum* (Bromeliaceae) in the iron quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *Am J Bot* 101:1–9
- Manhães VC, Miranda FD, Clarindo WR, Carrijo TT (2019) Genetic diversity and karyotype of *Pitcairnia azouaryi*: an endangered species of Bromeliaceae endemic to Atlantic Forest inselbergs. *Mol Biol Rep* 47:179–189
- Margis R, Caldas JF, Salgueiro F, Félix DB, Araujo DSD, Breyne P, Montagu MV, Oliveira D, Margis-Pinheiro M (2002) Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. *Biodivers Conserv* 11:149–163
- Martinelli G, Moraes A (2013) Livro Vermelho da Flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson
- Miranda FD, Gontijo ABPL, Santiliano FC, Favoreto FC, Soares TCB (2012) Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belong into the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae. *Biota Neotrop* 12:321–323
- Neri J, Nazareno AG, Wendt T, Palma-Silva C (2015) Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae. *Biochem Syst Ecol* 58:34–37
- Noor MAF, Feder JL (2006) Speciation genetics: evolving approaches. *Nat Rev Genet* 7:851–861
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Resour* 8:980–982
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbára T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2006) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliad species. *Mol Ecol Notes* 7:654–657
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbára T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103:503–512
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbára T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Mol Ecol* 20:3185–3201
- Pereira AG, Bernardi UCS, Manhães VC, Ferreira RS, Miranda FD (2017) Cross-amplification and characterization of microsatellite markers in *Alcantarea patriae* Versieux and Wand. *Genet Mol Res* 16:gmr16029692
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215–222
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J, Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. Smith (Bromeliaceae) a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Mol Ecol Notes* 3:221–223
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley PF (2004) MICRO-CHECKER: for identify in gend correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23:48–55
- Wöhrmann T, Weising K (2011) In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor Appl Genet* 123:635–647
- Wöhrmann T, Wagner N, Krapp F, Huettel B, Weising K (2012) Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Am J Bot* 99:160–163
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 98:1511–1519
- Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis MS, Bered F (2012) Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads. *Int J Mol Sci* 13:15859–15866
- Zenk FL, Firmer C, Wöhrmann T, Silva LV, Weising K, Huettel B, Paggi GM (2018) Development of 15 nuclear microsatellite markers in *Deuterocohnia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Appl Plant Sci* 6:1–7

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo 2

Evidências morfológicas e genéticas sobre o complexo *Stigmatodon goniorachis* (Tillandsioideae, Bromeliaceae), revelam uma nova espécie de *inselbergs* da Floresta Atlântica

Resumo

Neste estudo, abordamos os aspectos morfológicos e moleculares de espécies do complexo *Stigmatodon goniorachis* endêmico de *inselbergs* da Floresta Atlântica. Para a análise morfológica, utilizamos a morfometria em cinco indivíduos de sete localidades, com um total de 35 indivíduos. A análise genética foi realizada com oito microssatélites, em seis populações, com um total de 145 indivíduos, onde avaliamos a diversidade e estrutura genética populacional. Os resultados das análises de agrupamento revelaram a evidente separação das quatro espécies, além da formação de dois grupos distintos nas populações de *S. goniorachis*. Os principais componentes de variação revelados pela análise de PCA que sustentaram a separação das quatro espécies foram, o diâmetro de pedúnculo, o comprimento da bráctea floral, e o comprimento do receptáculo. Nas populações de *S. goniorachis* os principais componentes de variação revelados pela análise de PCA que sustentam essa separação foram o comprimento da bráctea floral, a largura da lâmina, e o comprimento da sépala. As características morfológicas observadas são correlacionadas com a estrutura genética populacional nas populações do complexo *S. goniorachis*. Os resultados moleculares revelaram que a riqueza alélica variou de 4.054 em *S. costae* – MT a 7.040 em *S. francae* – PH. A heterozigosidade observada variou de 0.557 em *S. goniorachis* – PT a 0.667 em *S. francae* – PH. O resultado da AMOVA evidenciou que 75.07% da variação genética está dentro das populações, e a ocorrência de fluxo gênico (N_m) variou de 0.285 – 8.370 entre os pares de populações estudadas. A análise bayesiana indicou que um modelo de $K = 4$ populações é capaz de explicar melhor a variação nos dados sobre a estrutura genética. O teste de Mantel não revelou correlação entre distância genética e geográfica ($r = 0.044$ $P < 0.01$). Tanto as análises morfológicas quanto as análises genéticas evidenciaram dois grupos distintos dentre as quatro populações inicialmente identificadas como *S. goniorachis*, o que levou a classificação e reconhecimento de um novo táxon de *Stigmatodon*, aqui descrito como *S. carioca* sp. nov. Este novo táxon apresenta características morfológicas peculiares em relação à distribuição de tricomas e pela postura da lâmina foliar revoluta quando comparadas às demais espécies que compõem o complexo *S. goniorachis*. Essas diferenças morfológicas foram representadas em uma tabela, com a inclusão de uma sinopse e uma chave

dicotômica de identificação dessas quatro espécies. Todas as espécies analisadas com exceção de *S. gonirachis* e *S. francae* (Em perigo e Vulnerável, respectivamente) estão enquadradas de acordo com a IUCN como “Criticamente em Perigo”, principalmente pela pequena área de distribuição e pelo declínio na qualidade do habitat). Além disso, nossos resultados revelam a importância dos *inselbergs*, considerados refúgios para a biodiversidade, com uma vegetação exclusiva, associada a condições muito peculiares. Portanto, estudos morfológicos e genéticos são ferramentas importantes para avaliar o grau de declínio e/ou conservação de populações destas espécies, além de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação do complexo *S. goniorachis*.

Palavras-chave: Afloramentos rochosos, Mata Atlântica, diversidade genética, microssatélites, morfometria.

2.1 Introdução

Bromeliaceae é uma das famílias de Angiospermas mais representativas em ambientes de *inselbergs* no Neotrópico, que são afloramentos rochosos graníticos e gnáissicos considerados “ilhas terrestres” por apresentar altos graus de isolamento (Porembski & Barthlott, 2000; Guerra, 2001). *Inselbergs* são encontrados em todo o mundo, mas no Brasil são especialmente concentrados nos domínios da Floresta Atlântica e da Caatinga, e comportam floras muito distintas das observadas na vegetação de seu entorno (Porembski *et al.*, 1998). Nessas áreas Bromeliaceae tem um número estimado de 102 espécies e 10 gêneros (De Paula *et al.*, 2020), sendo considerada uma das famílias com o maior número de espécies ameaçadas neste tipo de ambiente (Martinelli & Moraes 2013). Além disso, aproximadamente 80% das espécies de Bromeliaceae que ocorrem em *inselbergs* da Floresta Atlântica são endêmicos desses ambientes (De Paula *et al.*, 2016). Isso pode ser explicado pela sua ocorrência em ambientes isolados, com distribuição geográfica restrita e por apresentar pequenas populações (Forzza *et al.*, 2005).

O gênero *Stigmatodon* Leme, G.K. Br. & Barfuss, ocorre exclusivamente nas vertentes mais íngremes dos *inselbergs* da Floresta Atlântica. Este gênero é caracterizado

pelas folhas coriáceas com indumento lepidoto denso, lâminas geralmente triangulares, inflorescências com flores secundas, estames inclusos, organizados em três para cada lado da corola, e estigma tubo-laciniado, único entre as Bromeliaceae (Leme & Brown, 2004; Leme *et al.*, 2010; Leme, 2012; Leme *et al.*, 2014; Barfuss *et al.*, 2016). *Stigmatodon* possui 26 espécies distribuídas nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, dentro do domínio da Floresta Atlântica, nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, e nos afloramentos rochosos dos campos rupestres nos estados de Alagoas, Bahia e Pernambuco, na região nordeste do Brasil (Couto *et al.*, *in prep.*). Seu centro de diversidade é no Espírito Santo, onde ocorrem 12 espécies.

A região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro pode ser considerada um centro de diversidade secundário, localizado a 275 km do centro de diversidade primário, onde ocorrem quatro espécies morfologicamente semelhantes: *Stigmatodon brassicoides* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss, *S. costae* (B.R. Silva & Leme) Leme, G.K.Br. & Barfuss, *S. francae* D.R.Couto, Manhães & A.F.Costa e *S. goniorachis* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss. Os quatro táxons apresentam variações na postura, cor e indumento das lâminas foliares, assim como na forma e na cor das brácteas florais. Em geral, *S. brassicoides* possui menores dimensões em relação às demais. Entre as quatro, *S. goniorachis* é a que apresenta distribuição um pouco mais ampla e forma as maiores populações. Além disso, podem ser observados alguns indivíduos com inflorescência composta. *Stigmatodon costae* é conhecida apenas para a localidade-tipo, no Morro do Tucum, em Itacoatiara-Niterói, onde forma extensa população na face sul do *inselberg*. Dentre as quatro espécies *S. francae* é a que possui as maiores dimensões, além de possuir inflorescência sempre composta. *Stigmatodon francae* é conhecida apenas para localidade-tipo, na Pedra do Hime, em Jacarepaguá, Rio de Janeiro, formando extensa população na face norte do *inselberg*. Todas as espécies estão ameaçadas e enquadradas de acordo com a IUCN (2012) (pequena área de distribuição e declínio na qualidade do habitat) como “ criticamente em perigo”, com exceção de *S. goniorachis* e *S. francae* que estão enquadradas como “Em perigo” e “Vulnerável”, respectivamente (Couto *et al.*, *in prep.*; Couto *et al.*, 2020). Estas quatro espécies ocorrem em um conjunto de *inselbergs* litorâneos na região metropolitana do Rio de Janeiro, em área geográfica restrita, porém

nunca em simpatria (Couto *et al.*, *in prep.*). Tal situação geográfica pode influenciar na evolução dessas espécies levando à diferenciação de linhagens (Savolainen *et al.*, 2006).

A diversidade morfológica moldada pela distribuição dos seres vivos representa uma forma de evolução evidente, em que as diferenças e adaptações de um determinado organismo estão ligados ao habitat em que vivem (Ricklefs, 2003). Análises morfométricas podem fornecer dados importantes na delimitação de espécies, e apontar quais estruturas morfológicas são mais importantes na identificação e separação dos grupos, além de auxiliar no entendimento da dinâmica das populações vegetais (Doloso *et al.*, 2009; Webb *et al.*, 2010; Silva 2012; Newmaster *et al.*, 2008). Além disso, é possível verificar se variações na morfologia dos táxons estão associados a descontinuidades geográficas e a distribuição restrita das espécies (Small & Fawzy, 1992). As análises estatísticas multivariadas são ferramentas extensamente utilizadas em grupos de espécies taxonomicamente próximas, auxiliando em investigações com dados morfométricos e na relação entre variação morfológica e distribuição geográfica. Este tipo de análise já foi empregada em diversas famílias de Angiospermas, na elucidação de problemas, principalmente onde envolviam espécies relacionadas morfológicamente (Hess & Stoyhoff, 1998; Naczi *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2003; Henderson, 2005; Cardim *et al.*, 2001; Goldman *et al.*, 2004; Trovó *et al.*, 2008). Para Bromeliaceae, estes métodos foram usados para delimitar espécies de *Pitcairnia* (Wendt *et al.*, 2000), *Dyckia* (Guarçoni *et al.*, 2017), *Billbergia* (Jacques, 2015), *Tillandsia* (Castello & Galetto, 2013) e *Vriesea* (Costa *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2018, Uribbe *et al.*, 2020). Desta forma, a distribuição geográfica e o entendimento da variação morfológica são essenciais na delimitação de espécies relacionadas (Coyne & Orr, 2004; Savolainen *et al.*, 2006) e para o desenvolvimento de estratégias para sua conservação (Xu *et al.*, 2008).

Espécies com populações naturais distribuídas de forma restrita em *inselbergs* podem apresentar alta estruturação genética populacional como observado, por exemplo, em espécies de Orchidaceae (Pinheiro *et al.*, 2014), de Asphodelaceae (Tapper *et al.*, 2014), e também em diferentes gêneros de Bromeliaceae (Barbará *et al.*, 2007a, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2011; Hmeljevski *et al.*, 2014, 2015, 2017; Gonçalves-Oliveira *et al.*,

2017; Hirsh *et al.*, 2019; Mota *et al.*, 2019). Possivelmente, este cenário é acentuado pelo fluxo gênico restrito entre populações relativamente isoladas. Tais características, como o isolamento geográfico e o limitado fluxo gênico podem afetar a diversidade e a estrutura genética populacional e ocasionalmente desencadear outros processos evolutivos, como a especiação e a hibridação (Lowry *et al.*, 2008, Barton & Hewitt, 1985). Estes processos transcorrem pela divisão de populações em unidades evolutivas independentes, geralmente envolvendo a disjunção genética e a diferenciação morfológica (Coyne & Orr, 2004). Mecanismos evolutivos como os mencionados anteriormente, podem ser desencadeados por alterações em características geológicas, ecológicas/ambientais, morfológicas ou comportamentais, sendo altamente influenciados pela seleção natural e deriva genética (Petit & Excoffier, 2009).

Diante deste cenário, este estudo buscou compreender a influência da natureza isolada de *inselbergs* da Floresta Atlântica nos padrões de diversificação morfológica e molecular das espécies do complexo *Stigmatodon goniorachis* que ocorrem exclusivamente na região metropolitana do Rio de Janeiro, no sudeste do Brasil. Considerando o padrão de distribuição e o isolamento geográfico dos *inselbergs* onde ocorrem as espécies do complexo *S. goniorochis* buscamos testar as hipóteses de que essas populações expressam variações morfológicas consistentes devido ao tipo de ambiente e habitat particular de cada local; e que essas espécies apresentam baixa diversidade genética e alta estruturação entre as suas populações. Desta forma, os objetivos específicos deste estudo foram: (1) avaliar a variação morfológica intra e interespecífica do complexo *S. goniorachis*; e (2) avaliar a diversidade e estrutura genética populacional em três das quatro espécies que compõem o Complexo *S. goniorachis*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Identificação das áreas de ocorrência das espécies do complexo Stigmatodon goniorachis.

Para a identificação das áreas de ocorrência das espécies de *Stigmatodon* (*S. brassicoides*, *S. costae*, *S. francae* e *S. goniorachis*), foram realizadas consultas aos bancos de dados Flora do Brasil 2020 (em construção) e *SpeciesLink* (splink@cria.org.br). Constatou-se a existência de um pequeno número de exemplares coletados das quatro espécies. Em seguida, expedições a campo foram realizadas entre os meses de agosto de 2016 a maio de 2018, em *inselbergs* localizados na região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, para localização de populações naturais de cada uma destas espécies (Tabela 1, Fig. 1). Após a identificação dos locais de ocorrência, foi confeccionado um mapa de distribuição geográfica das espécies com auxílio do *software* QGIS 2.18.19 (QGIS Development Team, (2019)). Um testemunho para cada população foi coletado e herborizado segundo as técnicas usuais de trabalhos taxonômicos (Fidalgo & Bononi, 1989) e depositado no Herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro. As flores foram armazenadas em álcool 70%.

Tabela 1. Localização das populações das quatro espécies do Complexo *Stigmatodon goniorachis*. (*) Populações selecionadas para análise morfológica e molecular.

Espécie	Cidade	Local	Coordenadas	Elevação (m.s.m)
<i>S. brassicoides</i>	Rio de Janeiro	Pedra da Gávea*	22°59'53"S 43°17'42"O	660
<i>S. brassicoides</i>	Rio de Janeiro	Corcovado	22°58'09"S 43°12'42"O	495
<i>S. costae</i>	Niterói	Morro do Tucum*	22°58'25"S 43°01'36"O	79
<i>S. francae</i>	Rio de Janeiro	Pedra do Hime*	22°55'50"S 43°24'46"O	270
<i>S. goniorachis</i>	Niterói	Forte São Luiz	22°56'01"S 43°07'23"O	113
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Pão de Açúcar*	22°57'02"S 43°09'16"O	106
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Morro da Babilônia*	22°57'22"S 43°10'09"O	90
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Pico Andaraí Maior	22°56'20"S 43°16'42"O	758
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Pico da Tijuca*	22°56'36"S 43°17'18"O	850
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Morro São João*	22°57'40"S 43°10'51"O	132
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Morro da Urca	22°57'04"S 43°09'54"O	25
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Morro do Cantagalo	22°58'15"S 43°12'03"O	160
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Morro Dois Irmãos	22°59'27"S 43°14'27"O	260
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Pedra do Itanhangá	22°59'37"S 43°18'52"O	180
<i>S. goniorachis</i>	Rio de Janeiro	Grumari	23°02'09"S 43°30'05"O	260

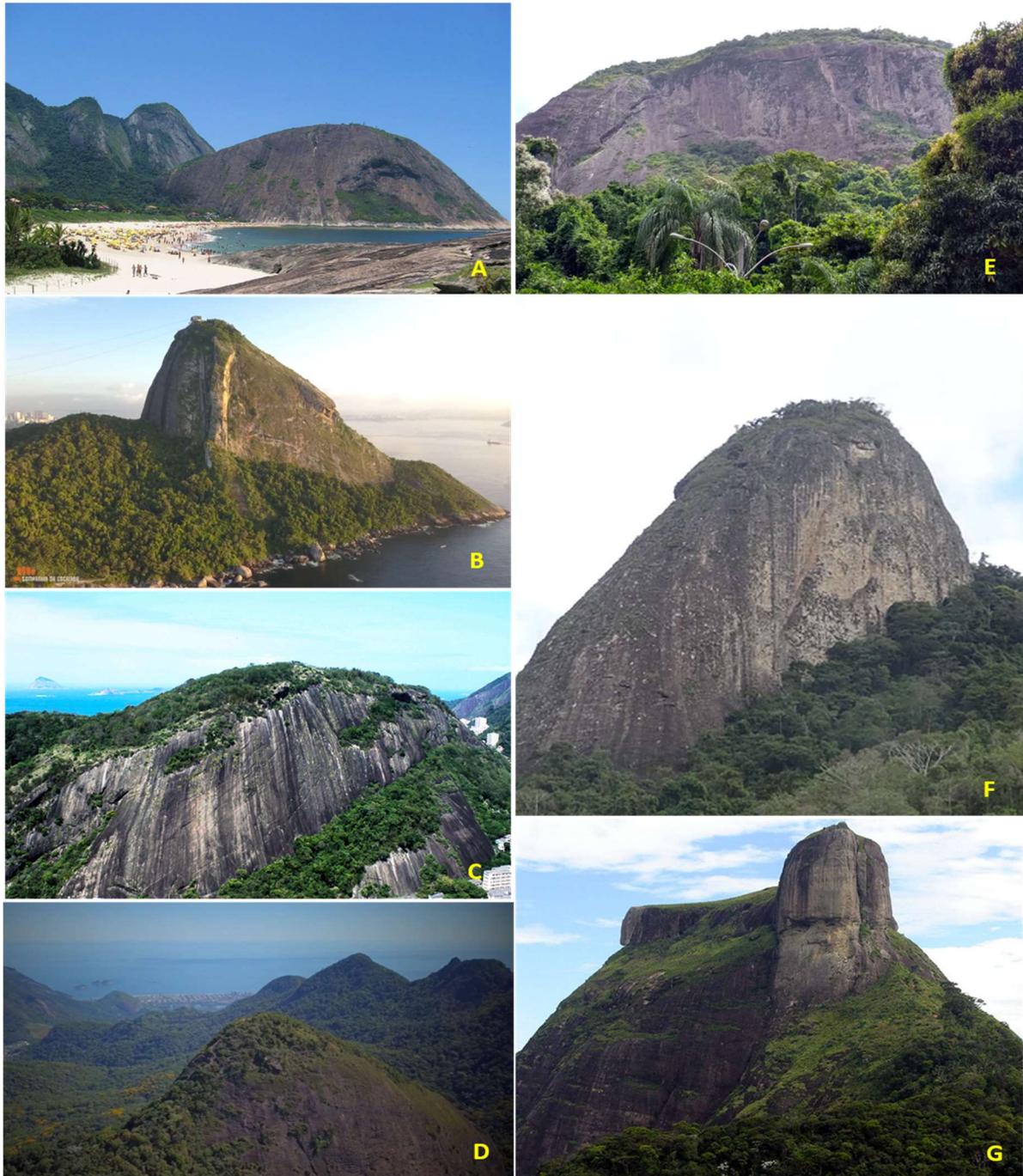


Figura 1. *Inselbergs* da região metropolitana do Rio de Janeiro selecionados para o estudo. (A) Morro do Tucum - MT, (B) Pão de Açúcar – PA, (C) Morro da Babilônia – MB, (D) Pico da Tijuca - PT (E) Morro São João – MSJ, (F) Pedra do Hime – PH, (G) Pedra da Gávea - PG (Photos: V.C. Manhães).

2.2.2 Populações amostradas

Das áreas identificadas, foi possível realizar as coletas em sete *inselbergs*, um para *Stigmatodon brassicoides*, um para *S. costae*, um para *S. francae* e quatro para *S. goniorachis*. Essas populações estão localizadas em uma área de 160Km², com altitudes variando de 79m a 950m acima do nível do mar (Fig. 2 e 3). Estes ambientes foram selecionados levando em consideração a distribuição geográfica das espécies e a logística de coleta das amostras, tendo em vista que esses táxons ocorrem em vertentes muito íngremes, sendo necessária a utilização de equipamentos especiais de escalada em rocha.

Por motivos logísticos, não foi possível realizar coletas em todos os pontos de ocorrência de *S. goniorachis*. O Rio de Janeiro possui sérios problemas sociais. Existem na cidade alguns maciços cujas encostas não são protegidas por unidades de conservação, sendo habitadas por população de baixa renda e tomadas por grupos armados e violentos que controlam o acesso aos seus territórios. Além disso, outras populações estão em locais que dificultam e/ou impedem a coleta de amostras devido à sua localização no próprio *inselberg*. O acesso difícil e o tamanho reduzido das populações inviabilizaram a obtenção de amostras para a análise genética de *S. brassicoides*.

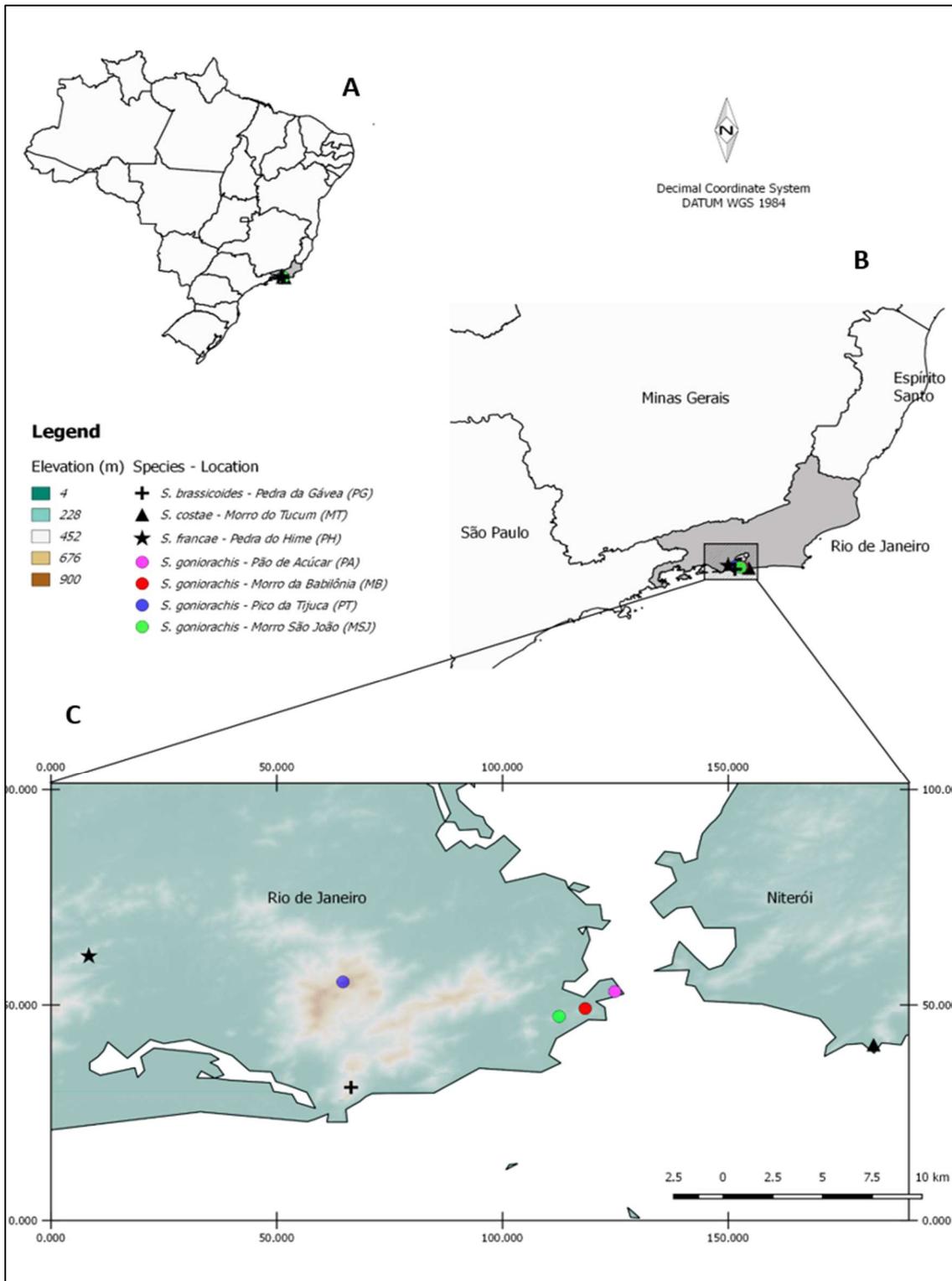


Figura 2. Distribuição dos pontos de coleta das quatro espécies do Complexo *Stigmatodon goniorachis* na região metropolitana do Rio de Janeiro. A- Brasil, B- Região Sudeste, C- Cidades do Rio de Janeiro e Niterói.

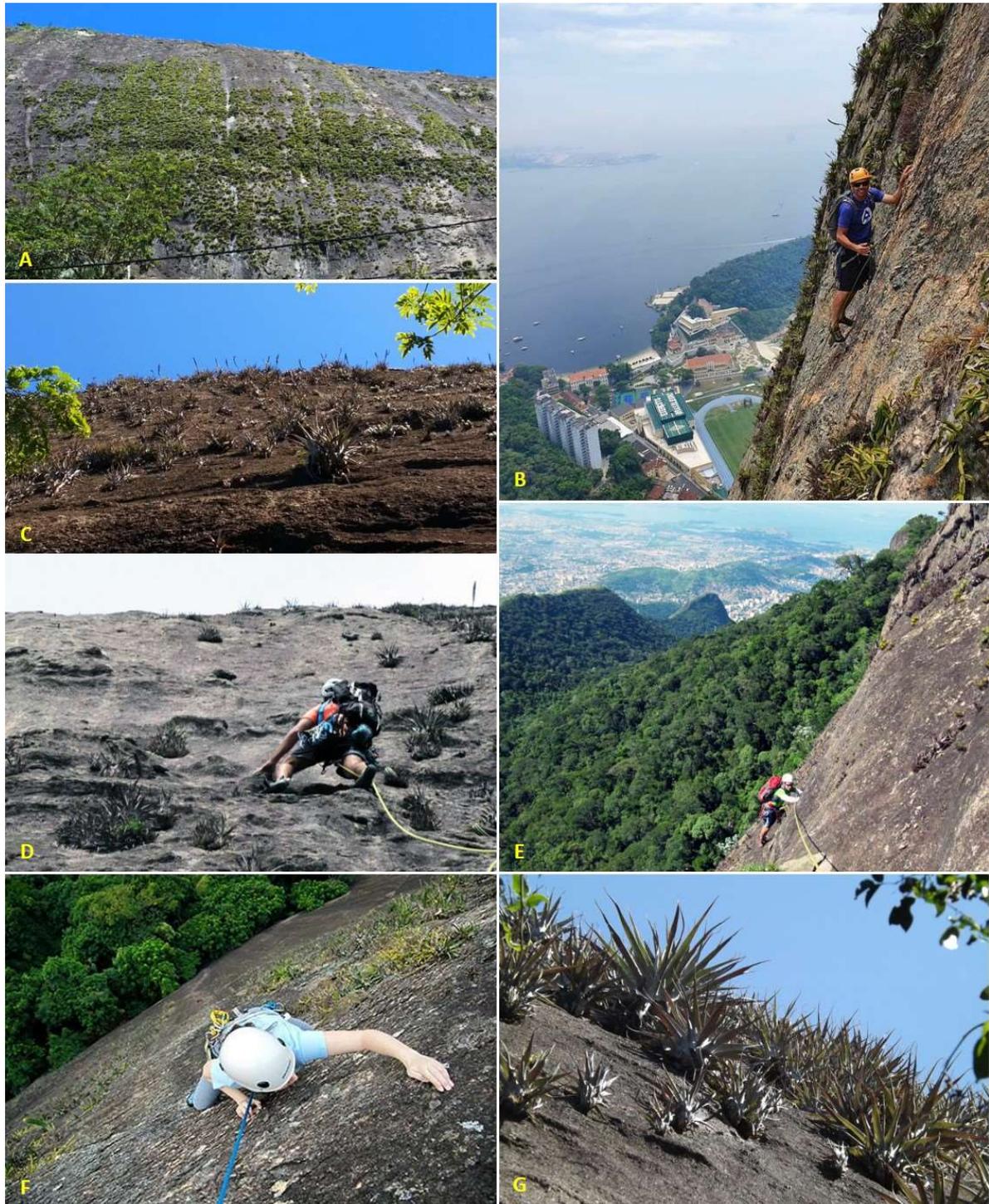


Figura 3. Coletas de algumas das espécies de *Stigmatodon* na região metropolitana do Rio de Janeiro. (A) *S. costae* – Morro do Tucum, (B) *S. goniorachis* – Pão de Açúcar, (C, D) *S. goniorachis* – Morro da Babilônia, (E) *S. goniorachis* – Pico da Tijuca, (F, G) *S. francae* – Pedra do Hime. (Photos: V.C. Manhães e M. Chiara).

2.2.3 Análises morfométricas

Foram coletados cinco indivíduos em cada local, de acordo com a disponibilidade de indivíduos férteis no *inselberg*, com um total de 35 indivíduos em sete populações. Folhas e peças florais totalmente desenvolvidas, tiveram suas dimensões mensuradas e analisadas com relação à forma, presença e tipo de indumento. A cor das flores e folhas observadas no campo, também foram incluídas nas análises. As análises foram realizadas com as quatro espécies que compõem o complexo *S. goniorachis* em conjunto, e também somente com as populações de *S. goniorachis* separadamente. Os dados obtidos foram tabulados em matrizes de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) x variáveis morfológicas quantitativas (19) e qualitativas (7) (Tabela 2), para realização de análises de ordenação e agrupamento. Para análise de agrupamento foi utilizado o índice de Gower como medida de similaridade (Legendre & Legendre, 1998), e o critério de ligação média entre grupos (*Unweighted pair group method with arithmetic mean* - UPGMA). Para a ordenação das OTU's e as variáveis quantitativas, foram utilizados os métodos de análise de correspondência distendida (DCA) para verificar o tamanho do gradiente e posteriormente a análise dos componentes principais (PCA) para analisar quais caracteres morfológicos eram responsáveis para a formação dos possíveis grupos (Legendre & Legendre, 1998). Para todas as análises foram utilizados os *softwares* Fitopac 1.6 (Shepherd, 2010), PC-Ord 4.10 (McCune & Mefford, 1999) e Past v3.0 (Hammer *et al.*, 2001). As análises de agrupamento e ordenação das variáveis quantitativas e qualitativas foram efetuadas com base na matriz de caracteres do material suplementar 1.1 e 1.2.

Tabela 2. Caracteres quantitativos e qualitativos utilizados na análise morfométrica das espécies do complexo *Stigmatodon gonirachis*, com seus respectivos códigos.

Characters	Character Code
<u>Quantitative character</u>	
<i>Leaf sheath, length (cm)</i>	LSL
<i>Leaf sheath, width (cm)</i>	LSW
<i>Leaf blade, length (cm)</i>	LBL
<i>Leaf blade, width (cm)</i>	LBW
<i>Inflorescence, total length (cm)</i>	ITL
<i>Peduncle, diameter (cm)</i>	PED
<i>Peduncle bract, length (cm)</i>	PBL
<i>Peduncle bract, width (cm)</i>	PBW
<i>Inflorescence median internode, length (cm)</i>	IML
<i>Floral bract, length (cm)</i>	FBL
<i>Floral bract, width (cm)</i>	FBW
<i>Receptacle, length (cm)</i>	RCL
<i>Receptacle, diameter (cm)</i>	RCD
<i>Sepal, length (cm)</i>	SPL
<i>Sepal, width (cm)</i>	SPW
<i>Petal, length (cm)</i>	PTL
<i>Petal, width (cm)</i>	PTW
<i>Stamens, length (cm)</i>	STL
<i>Pistil, length (cm)</i>	PSL
<u>Qualitative character</u>	
<i>Leaf, color (green-0, wine-green-1)</i>	LVC
<i>Petal, color (white-0, greenish-white-1)</i>	PTC
<i>Leaf trichomes (absent-0, present-1)</i>	LTR
<i>Leaf, longitudinal posture (patent-0, twisted-1)</i>	LLP
<i>Inflorescence branching pattern (simple-0, compound-1)</i>	IBP
<i>Floral bracts, color (green-0, wine-green-1)</i>	FBC
<i>Leaf, margin (convolute-0, revolute-1)</i>	LFM

2.2.4 Diversidade e estrutura genética populacional

2.2.4.1 Amostras, extração de DNA e Microsatélites

O material para o estudo de diversidade e estrutura genética foi obtido através da coleta de folhas frescas de 20-25 indivíduos/população de *S. costae*, *S. francae* e *S. goniorachis*. Devido a viabilidade e logística de obtenção das amostras, não foi possível realizar coletas nos pontos de ocorrência de *S. brassicoides*. A extração e purificação de DNA foi realizada pelo protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) (Doyle & Doyle, 1990) de acordo com as modificações descritas por Margis *et al.* (2002). Para as análises genéticas foram utilizados oito *loci* microsatélites já testados previamente (Manhães *et al.* 2020) e descritos para outras espécies de Bromeliaceae e previamente transferidos para as espécies do complexo *S. goniorachis*: ACPTC138A, CT5, Pit8, VgA04, VgB10, VgC01, VgF02, VgG02, (Boneh *et al.*, 2003; Kinsuat & Kumar, 2007; Sarthou *et al.*, 2003; Palma-Silva *et al.*, 2006). As reações de PCR e genotipagem foram efetuadas de acordo com as condições descritas por Manhães *et al.* (2020).

2.2.4.2 Análise dos dados

Os padrões de diversidade genética dentro das populações foram caracterizados pelo cálculo dos seguintes parâmetros: número de alelos (A), riqueza alélica (R_s), número de alelos privados (A_p), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e), e o coeficiente de endogamia (F_{is}) (Weir & Cockerham, 1984). Os parâmetros de diversidade genética foram estimados com os softwares Arlequin (Excoffier, 2007) e Fstat2.9.3 (Goudet, 1995).

As estatísticas F (Weir & Cockerham, 1984) foram utilizadas para avaliar os níveis de diversidade genética dentro e entre as populações. O grau de diferenciação genética F_{st} (Wright, 1965) foi estimado com o programa Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995) e o R_{st} (Slatkin, 1995) com o *software* Arlequin (Excoffier, 2007), com teste de significância com 1.000 permutações. O particionamento da diversidade genética tanto dentro como entre as populações e também dentro dos grupos (espécies), foi avaliada por análise de variância molecular (AMOVA) realizada com o programa Arlequin (Excoffier, 2007),

sendo sua significância estimada pela estatística F e testados utilizando-se 10.000 permutações.

A estrutura genética das populações também foi avaliada pela delimitação de grupos genéticos por análise Bayesiana por meio do programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) para inferir o número de *clusters* (K), usando o modelo de alelos independentes. Foram realizadas execuções de $K = 1$ até $K = 9$ com 250.000 interações iniciais (*burn-ins*) e 750.000 simulações de Monte Carlo através da cadeia de Markov (MCMC). Para definição do valor K mais provável, utilizamos o *website* Structure Harvester (Pritchard *et al.*, 2000).

A hipótese de isolamento por distância foi testada através do Teste de Mantel utilizando-se o *software* Arlequin (Excoffier, 2007), com duas matrizes distintas, comparando as populações duas a duas, uma matriz com a diferenciação genética (R_{st}), e outra com a distância geográfica (km) entre as populações. O fluxo gênico histórico foi calculado pela fórmula $N_m = 0.25(1/R_{st} - 1)$ (Wright 1921, 1922; Slatkin, 1995), comparando as populações duas a duas. As distâncias genéticas de Nei (1978) par a par entre as populações foram calculadas pelo *software* GDA, para formação dos grupos. Os valores encontrados subsidiaram a construção de um dendrograma pelo método de agrupamento Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) e UPGMA (Swofford & Olsen, 1990), com *bootstrap* de 10000 réplicas ($P < 0.05$). Reduções recentes no tamanho populacional (“*bottleneck*”) foram testadas baseando-se no excesso de heterozigosidade relativo ao número de alelos usando o método de coalescência implementado no *software* BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). A análise foi realizada sob o “stepwise mutation model” (SMM). A significância do excesso de heterozigotos foi testada usando “one-tailed Wilcoxon signed-ranked test”, como recomendado por Piry *et al.* (1999), para amostras com menos de 20 *loci* polimórficos.

2.2.5 Tratamento taxonômico

As análises morfológicas foram realizadas a partir de espécimes coletados durante as expedições realizadas às áreas onde ocorrem as populações do complexo *S. goniorachis*, nos espécimes depositados nos herbários do Museu Nacional do Rio de Janeiro (R) e do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), observação de campo e pelo exame de espécimes cultivados. Durante as expedições, foram anotadas informações referentes aos caracteres morfológicos, por exemplo: postura da lâmina foliar, coloração das folhas, brácteas, flores. Também foi realizada documentação fotográfica dos habitats e de detalhes vegetativos e reprodutivos das espécies. Para auxiliar na identificação do material, foram utilizadas as obras originais das espécies, análise dos espécimes-tipo e material fotográfico de espécimes vivos.

O tratamento taxonômico apresenta uma descrição do gênero e uma chave dicotômica para identificação dos táxons que compõem o complexo *S. goniorachis*. Além disso, fornecemos dados detalhados sobre sua morfologia, apresentando variações dentro e entre populações distintas. As abreviações dos nomes dos autores seguiram IPNI (www.ipni.org). A terminologia das estruturas vegetativas e reprodutivas seguem Radford *et al.* (1974), Smith & Downs (1977) e Barfuss *et al.* (2016). Os basônimos e os sinônimos encontram-se indicados após o cabeçalho das espécies, e ordenados de acordo com a data de publicação dos táxons. As delimitações das espécies foram conduzidas com todos os dados morfológicos disponíveis, incluindo resultados morfométricos de caracteres quantitativos.

2.2.6 Avaliação do grau de ameaça de extinção

A avaliação do estado de conservação de *S. goniorachis* e *S. carioca sp. nov.* segue as Categorias e Critérios da Lista Vermelha da IUCN (IUCN, 2012). As outras espécies já haviam sido avaliadas previamente seguindo os mesmos critérios da IUCN por outros autores.

2.3 Resultados

2.3.1 Análises morfométricas

2.3.1.1 Complexo *Stigmatodon goniorachis*

As análises de agrupamento UPGMA revelaram a evidente separação das quatro espécies em estudo com coeficiente de correlação cofenética de 0.929. As populações de *S. francae* - Pedra do Hime (PH), *S. brassicoides* - Pedra da Gávea (PG) e *S. costae* - Morro do Tucum (MT), formaram grupos distintos das demais populações. Nas populações de *S. goniorachis* houve a formação de dois grupos, um com as populações de Pão de Açúcar (PA) e Morro São João (MSJ), e outro com as populações de Morro da Babilônia (MB) e Pico da Tijuca (PT) (Fig. 4).

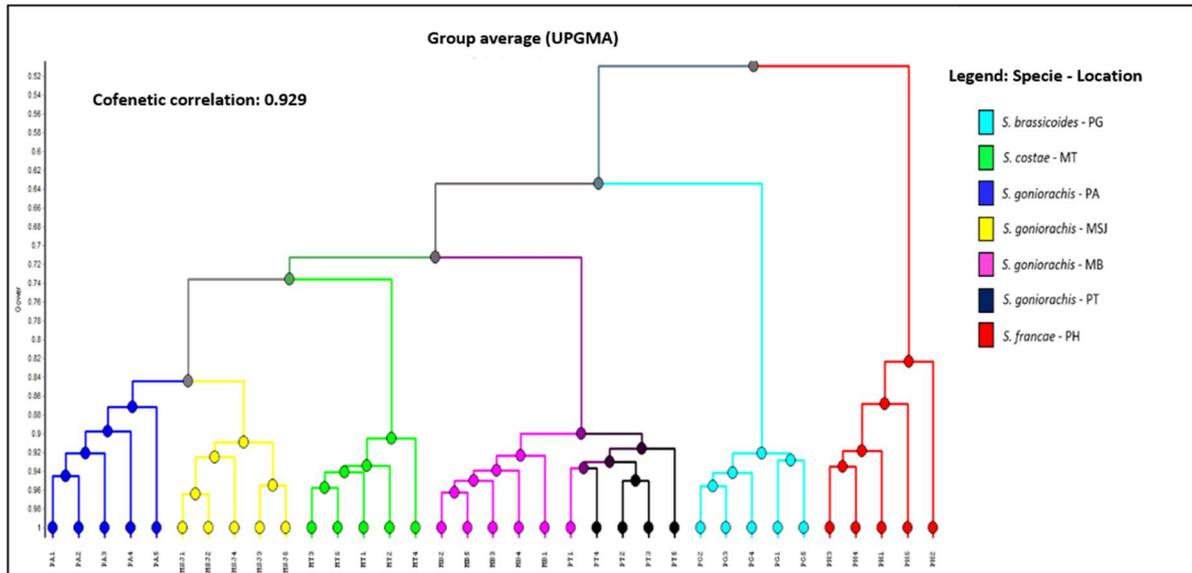


Figura 4. Análise de agrupamento entre populações das quatro espécies do complexo *S. goniorachis*. *S. brassicoides* (Pedra da Gávea – PA), *S. costae* (Morro do Tucum – MT), *Stigmatodon goniorachis* (Pão de Açúcar – PA), *Stigmatodon goniorachis* (Morro São João – MSJ), *S. goniorachis* (Morro da Babilônia – MB), *S. goniorachis* (Pico da Tijuca – PT), *S. francae* (Pedra do Hime – PH).

A análise de correspondência distendida (DCA) revelou um gradiente com valor de 1.69. Esse valor de gradiente torna possível a aplicação da análise de componentes principais (PCA). A análise de ordenação dos componentes principais (PCA) evidenciou que os dois primeiros eixos explicam cerca de 73% da variação total. As populações de *S. brassicoides* – Pedra da Gávea (PG), *S. costae* – Morro do Tucum (MT) e *S. francae* – Pedra do Hime (PH), ficaram relativamente separadas. No eixo 1, os principais caracteres morfológicos que explicam essa separação são o (*peduncle diameter* – PED), (*floral bract, length* – FBL) e (*Receptacle length* – RCL) com 49,14% de variação, e no eixo 2 foram o (*pistil length* – PSL), o (*petal length* – PTL), e o (*stamens length* – STL) com 23.57% de variação (Fig. 5, Tabela 3). As populações de *S. goniorachis* aparecem distribuídas no lado negativo do eixo 1.

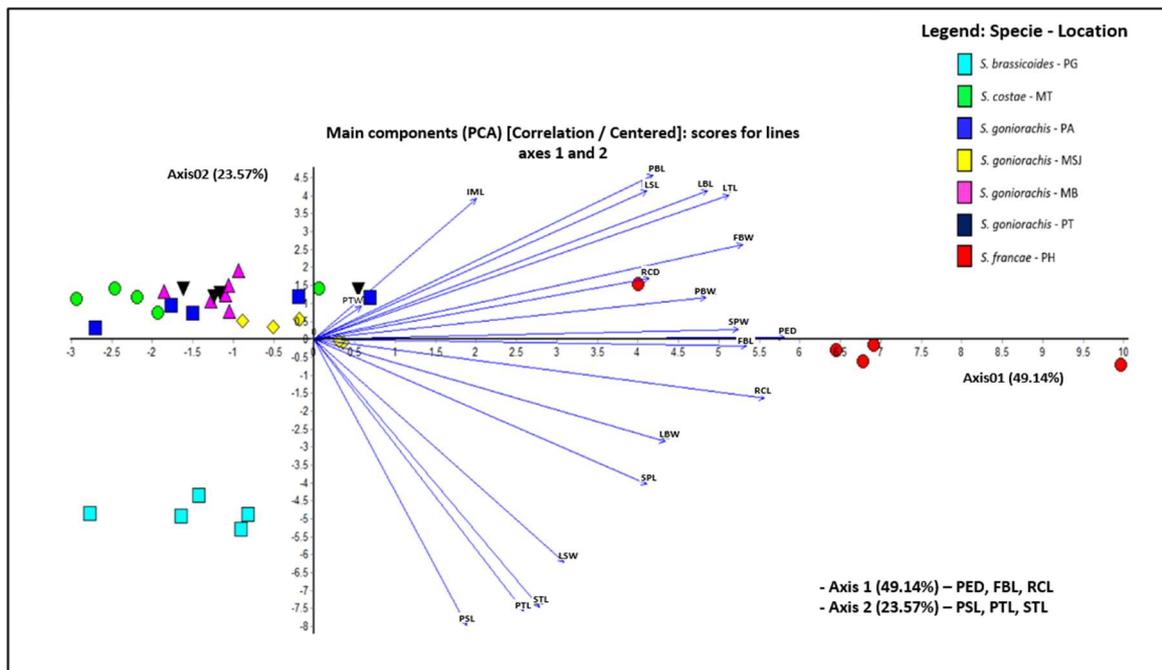


Figura 5. Análise de componentes principais (PCA) em populações das quatro espécies do complexo *S. goniorachis*. *S. brassicoides* (Pedra da Gávea – PA), *S. costae* (Morro do Tucum – MT), *S. goniorachis* (Pão de Açúcar – PA), *S. goniorachis* (Morro São João – MSJ), *S. goniorachis* (Morro da Babilônia – MB), *S. goniorachis* (Pico da Tijuca – PT), *S. francae* (Pedra do Hime – PH).

Tabela 3. Correlações entre variáveis e eixos mostrando a variação entre caracteres morfológicos. Os três valores mais representativos em cada eixo da PCA estão marcados em negrito.

Lines	Axis 01	Axis 02	Lines	Axis 01	Axis 02
LSW	0.1674	-0.3366	FBW	0.2866	0.1430
LSL	0.2225	0.2238	RCL	0.3009	-0.0883
LBW	0.2349	-0.1540	RCD	0.2243	0.0920
LBL	0.2633	0.2242	SPL	0.2227	-0.2184
ITL	0.2775	0.2173	SPW	0.2837	0.0147
PED	0.3143	0.0026	PTL	0.1398	-0.4098
PBL	0.2266	0.2477	PTW	0.0315	0.0494
PBW	0.2619	0.0625	STL	0.1510	-0.4043
IML	0.1087	0.2124	PSL	0.1020	-0.4318
FBL	0.2892	-0.0097			

2.3.1.2 Populações de *Stigmatodon goniorachis*

A análise de agrupamento UPGMA com populações de *S. goniorachis* revelou a separação de diferentes populações e agrupamento de indivíduos de uma mesma população desta espécie, com coeficiente de correlação cofenética de 0.84. Houve a formação de um grupo distinto com indivíduos de Morro São João – MSJ, dois grupos proximamente relacionados com indivíduos de Pão de Açúcar – PA, e um grande grupo heterogêneo composto por indivíduos das populações de Morro da Babilônia – MB e Pico da Tijuca – PT (Fig. 6).

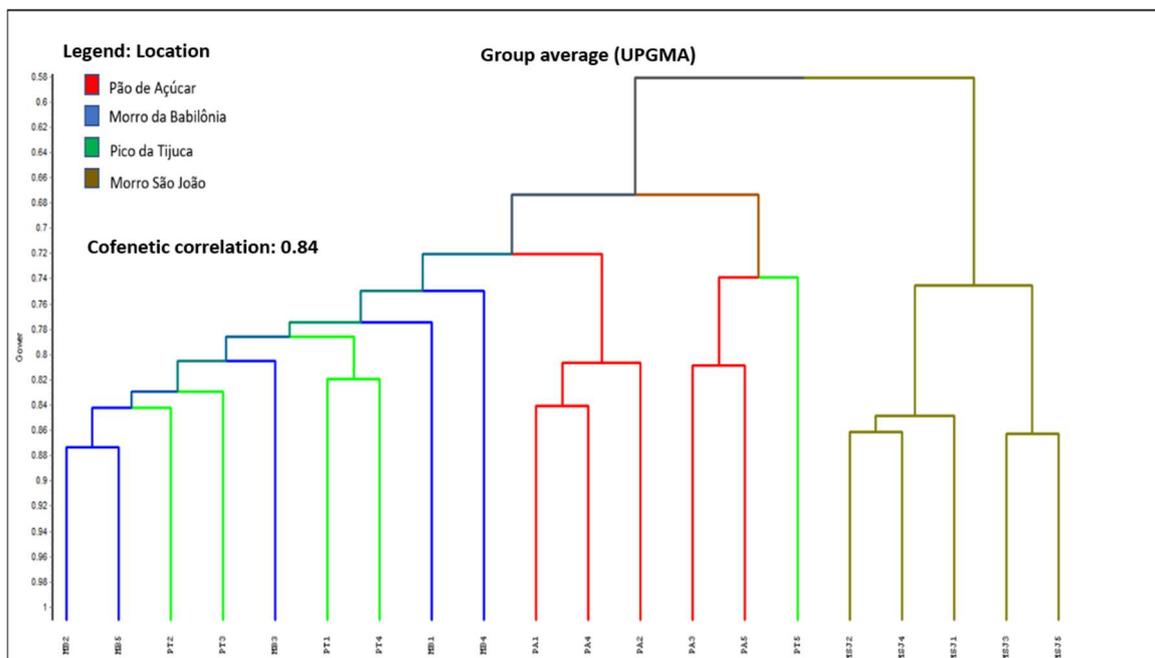


Figura 6. Análise de agrupamento UPGMA em quatro populações de *Stigmatodon goniorachis*. (PA – Pão de Açúcar, MB – Morro da Babilônia, PT – Pico da Tijuca, MSJ – Morro São João).

A análise de correspondência distendida (DCA) revelou um gradiente com valor de 1.244. Esse valor de gradiente torna possível a aplicação das análises de componentes principais (PCA). A análise de ordenação dos componentes principais (PCA) entre as populações de *S. goniorachis* revelou que os dois primeiros eixos explicam cerca de 60% da variação total (Fig. 7). A maioria dos indivíduos das populações de Pão de Açúcar (PA) e Morro São João (MSJ) ficou evidentemente separada em um lado do gráfico. Em contraste, os indivíduos das populações de Morro da Babilônia (MB) e Pico da Tijuca (PT) ficaram do outro lado do gráfico, com sobreposição de alguns indivíduos das duas populações. A separação e formação dos grupos foram reveladas no eixo 1 principalmente pela (*floral bract length* – FBL), (*leaf blade width* – LBW) e (*sepal length* – SPL) com 41.81% da variação total, e no eixo 2 pelo (*receptacle length* – RCL), (*inflorescence total length* – ITL) e (*peduncle diameter* – PED) com 18,46% da variação total (Tabela 4).

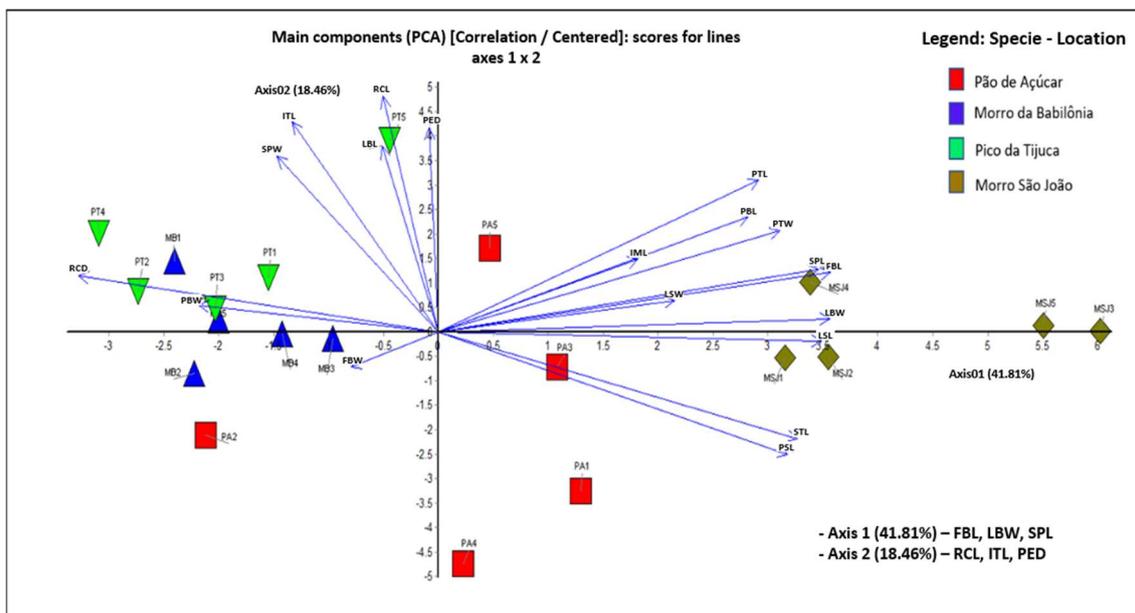


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) em quatro populações de *S. goniorachis*. (PA – Pão de Açúcar, MB – Morro da Babilônia, PT – Pico da Tijuca, MSJ – Morro São João).

Tabela 4. Correlações entre variáveis e eixos mostrando a variação entre caracteres morfológicos. Os três valores mais representativos em cada eixo estão em negrito.

Lines	Axis01	Axis 02	Lines	Axis 01	Axis 02
LSW	0.5419	0.1067	FBW	-0.2002	-0.1201
LSL	0.8797	-0.0308	RCL	-0.1269	0.8076
LBW	0.8984	0.0439	RCD	-0.8265	0.1923
LBL	-0.1291	0.6360	SPL	0.8721	0.2146
ITL	-0.3364	0.7190	SPW	-0.3706	0.6039
PED	-0.0211	0.7012	PTL	0.7348	0.5191
PBL	0.7107	0.3942	PTW	0.7840	0.3459
PBW	-0.5499	0.0904	STL	0.8239	-0.3658
IML	0.4570	0.2490	PSL	0.8017	-0.4198
FBL	0.8992	0.2042			

2.3.2 Análises moleculares

Os oito marcadores microssatélites utilizados geraram produtos de amplificação satisfatórios e polimórficos, sendo que três destes apresentaram alelos nulos (VgF02, VgA04 e CT5), que foram identificados e corrigidos com o auxílio do *software* Microchecker 2.2.3 (*Brookfield* 1, estimador). O número de alelos por locus variou de quatro (VgC01) a 20 (VgG02), com média de 13 alelos por locus. O valor médio de riqueza alélica (A_r) foi de 9.224. Os valores para heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), variaram por *loci* entre 0.525-0.777 e 0.434-0.881, respectivamente. Nenhum dos *loci* em estudo se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.01$). A média dos valores de índice de fixação foi $F_{is} = 0.06$ (Material suplementar 2)

A heterozigosidade esperada e observada por população variou de 0.550 em *S. costae* – MT e 0.762 em *S. francae* – PH e 0.557 em *S. goniorachis* – PT e 0.667 em *S. francae* – PH, respectivamente. Estes valores demonstram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.01$) para todas as populações. A população de *S. francae* de Pedra do Hime - PH teve a maior riqueza alélica (7.040) e também o maior número de alelos privados (9). A população de *S. costae* de Morro do Tucum apresentou os menores valores riqueza alélica (4.054). O maior valor do índice de fixação (F_{is}) foi de 0.144 ($P < 0.01$) na população de *S. goniorachis* no Pico da Tijuca – PT. A diferenciação genética entre as seis populações foi alta ($R_{st} = 0.274$) e significativa ($P < 0.01$), (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados dos parâmetros genéticos estimados das espécies do complexo *S. goniorachis* dentro de cada população. N = número de indivíduos, A_p = alelos privados, A_r = riqueza alélica, H_o = heterozigosidade observada, H_e = heterozigosidade esperada, F_{is} = índice de fixação (* $P < 0.01$).

Espécie	População	N	A_p	A_r	H_e	H_o	F_{is}^*
<i>S. costae</i>	MT	25	2	4.054	0.550	0.585	- 0.066*
<i>S. goniorachis</i>	PA	25	1	4.938	0.628	0.625	0.006
<i>S. goniorachis</i>	MB	25	3	4.875	0.663	0.630	0.052*
<i>S. goniorachis</i>	PT	25	3	4.878	0.649	0.557	0.144*
<i>S. goniorachis</i>	MSJ	20	4	5.250	0.591	0.568	0.039
<i>S. francae</i>	PH	25	9	7.040	0.762	0.667	0.14

As análises de reduções recentes no tamanho populacional efetuadas no *software* BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996) não revelaram valores significativos do excesso de heterozigotos no modelo “one-tailed Wilcoxon signed-ranked test” em todas as populações estudadas ($P > 0.05$), indicando que estas populações não passaram por gargalos populacionais (Material suplementar 3).

A Análise de variância molecular (AMOVA) revelou 1.41% de variância genética entre os grupos (espécies), 23.51% entre populações dentro dos grupos (espécies), e 75.07% dentro das populações (Tabela 6).

Tabela 6. Amova nas populações das três espécies de *Stigmatodon*.

Variation Source	Variation Components	Percentage of Change
Between groups (species)	0.048	1.412%
Between populations within groups (species)	0.801	23.516%
Within populations	2.571	75.070%

A análise Bayesiana indicou que um modelo de $K = 4$ populações é capaz de captar melhor a variação nos dados relativos à estruturação genética (Fig. 8). No primeiro agrupamento está a população de *S. costae* – Morro do Tucum (MT), no segundo agrupamento estão *S. goniorachis* – Pão de Açúcar (PA) e Morro São João (MSJ), no terceiro agrupamento estão *S. goniorachis* - Morro da Babilônia (MB) e Pico da Tijuca (PT), e no quarto agrupamento está *S. francae* – Pedra do Hime (PH) (Fig. 9).

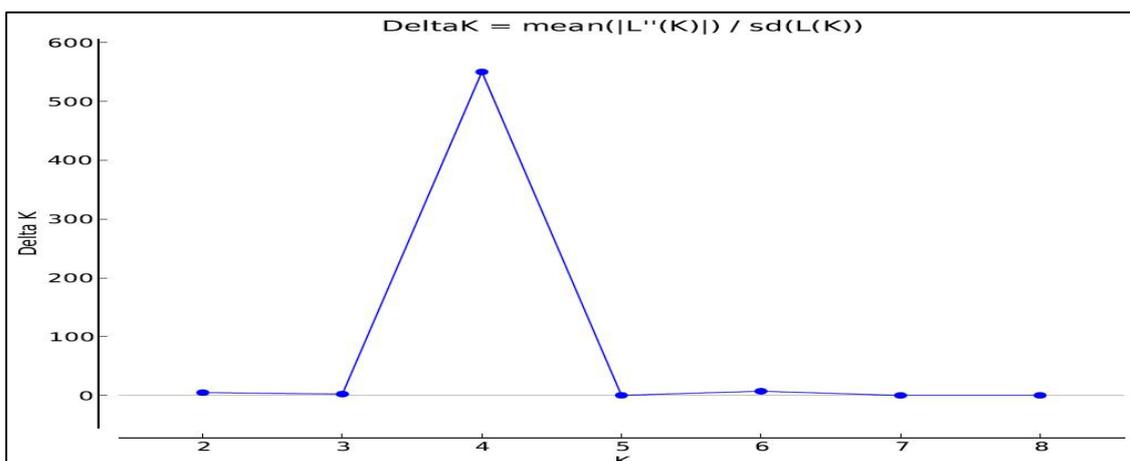


Figura 8. Gráfico do método de agrupamento mostrando o melhor ΔK .

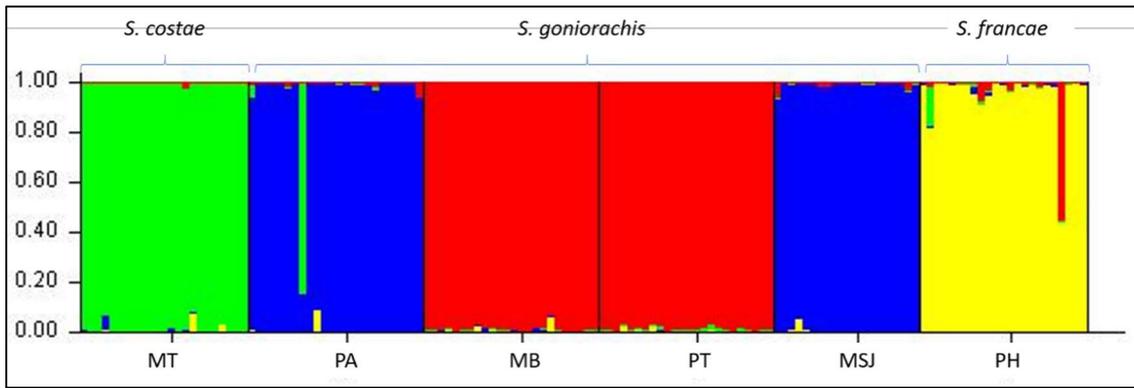


Figura 9. Resultados da análise bayesiana de 145 indivíduos de seis populações representando as quatro espécies que ocorrem em *inselbergs* na Floresta Atlântica do Rio de Janeiro, com base em oito *loci* microssatélites. Representação gráfica das diferentes misturas genéticas para $K = 4$. Populações são separadas por barras verticais, MT – Morro do Tucum, PA – Pão de Açúcar, MB – Morro da Babilônia, PT – Pico da Tijuca, MSJ – Morro São João, PH – Pedra do Hime.

A estruturação genética (R_{st}) entre as populações foi de 0.274. O maior valor de estruturação genética por pares de populações foi entre as populações de *S. costae* (MT) x *S. goniorachis* (MB) e *S. costae* (MT) x *S. goniorachis* (PT), e os menores valores foram encontrados entre as populações de *S. goniorachis* (PA) x *S. goniorachis* (MSJ). O fluxo gênico histórico (N_m) entre as populações foi de 0.662 migrantes por geração, sendo o maior fluxo gênico entre pares de populações foram entre PA x MSJ, ($N_m = 8.370$). As populações que apresentaram o menor valor de migrantes foram MB x MT ($N_m = 0.285$), (Tabela 7).

Tabela 7. Estruturação genética e fluxo gênico indireto por pares de populações. Valores abaixo da diagonal R_{st} = estruturação genética entre as populações; acima da diagonal valores de N_m = número de migrantes por geração.

	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>
Espécie - Localidade	<i>costae</i> MT	<i>goniorachis</i> PA	<i>goniorachis</i> MB	<i>goniorachis</i> PT	<i>goniorachis</i> MSJ	<i>francae</i> PH
<i>S. costae</i>						
MT	-	0.665	0.285	0.332	0.586	0.923
<i>S. goniorachis</i>						
PA	0.273	-	0.391	0.512	8.370	0.993
<i>S. goniorachis</i>						
MB	0.467	0.390	-	1.850	0.370	0.679
<i>S. goniorachis</i>						
PT	0.429	0.328	0.119	-	0.422	0.902
<i>S. goniorachis</i>						
MSJ	0.299	0.029	0.403	0.372	-	0.774
<i>S. francae</i>						
PH	0.213	0.201	0.269	0.217	0.244	-

A correlação de Mantel entre diferenciação genética (R_{st}) e geográfica (Km) não foi significativa ($r = 0.044$, $P < 0.01$), sugerindo que o isolamento genético observado entre as populações não é correlacionado com as distâncias geográficas observadas entre elas (Tabela 8).

Tabela 8. Estruturação genética e distância geográfica entre pares de populações. Abaixo da diagonal = R_{st} ; acima da diagonal = distância geográfica (Km).

	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>
Espécie -	<i>costae</i>	<i>goniorachis</i>	<i>goniorachis</i>	<i>goniorachis</i>	<i>goniorachis</i>	<i>francae</i>
Localidade	MT	PA	MB	PT	MSJ	PH
<i>S. costae</i>						
MT	0	13.50	14.80	27.0	13.0	40.0
<i>S. goniorachis</i>						
PA	0.273	0	1.50	13.50	3.10	26.50
<i>S. goniorachis</i>						
MB	0.467	0.390	0	12.50	1.70	25.30
<i>S. goniorachis</i>						
PT	0.429	0.328	0.119	0	11.0	13.0
<i>S. goniorachis</i>						
MSJ	0.299	0.029	0.403	0.372	0	23.90
<i>S. francae</i>						
PH	0.213	0.201	0.269	0.217	0.244	0

A distâncias genéticas de Nei (1978) par a par entre as populações revelou que a maior e a menor distância foram encontradas entre as populações de *S. goniorachis*, a maior entre Pico da Tijuca (PT) e Morro São João (MSJ) e a menor entre Pão de Açúcar (PA) e Morro São João (MSJ), (Tabela 9).

Tabela 9. Matriz de distância genética (Nei, 1978) usada pelo *software* GDA para formar grupos. Valores abaixo da matriz diagonal de distância genética entre populações.

	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>
Espécie -	<i>costae</i>	<i>goniorachis</i>	<i>goniorachis</i>	<i>goniorachis</i>	<i>goniorachis</i>	<i>francae</i>
Localidade	MT	PA	MB	PT	MSJ	PH
<i>S. costae</i>						
MT	-					
<i>S. goniorachis</i>						
PA	0.284	-				
<i>S. goniorachis</i>						
MB	0.295	0.266	-			
<i>S. goniorachis</i>						
PT	0.281	0.272	0.148	-		
<i>S. goniorachis</i>						
MSJ	0.306	0.091	0.301	0.312	-	
<i>S. francae</i>						
PH	0.257	0.229	0.177	0.177	0.231	-

Os dendrogramas obtidos através dos métodos de agrupamento Neighbor-Joining e UPGMA com os resultados das distâncias genéticas estão evidenciados nas fig. 10 e 11. No método Neighbor-Joining *S. costae* - MT ficou mais próxima de *S. goniorachis* - PA e *S. goniorachis* - MSJ, e *S. francae* - PH sendo a mais distante entre todas elas. Nos resultados de UPGMA observamos uma pequena diferença na formação dos grupos, onde *S. francae* - PH ficou mais próxima de *S. goniorachis* - MB e *S. goniorachis* - PT, e *S. costae* sendo a mais distante entre as demais. Entretanto os resultados de ambos os métodos de agrupamento revelaram que os grupos mais próximos estão entre *S. goniorachis* - PA e *S. goniorachis* - MSJ, e entre *S. goniorachis* - MB e *S. goniorachis* - PT.

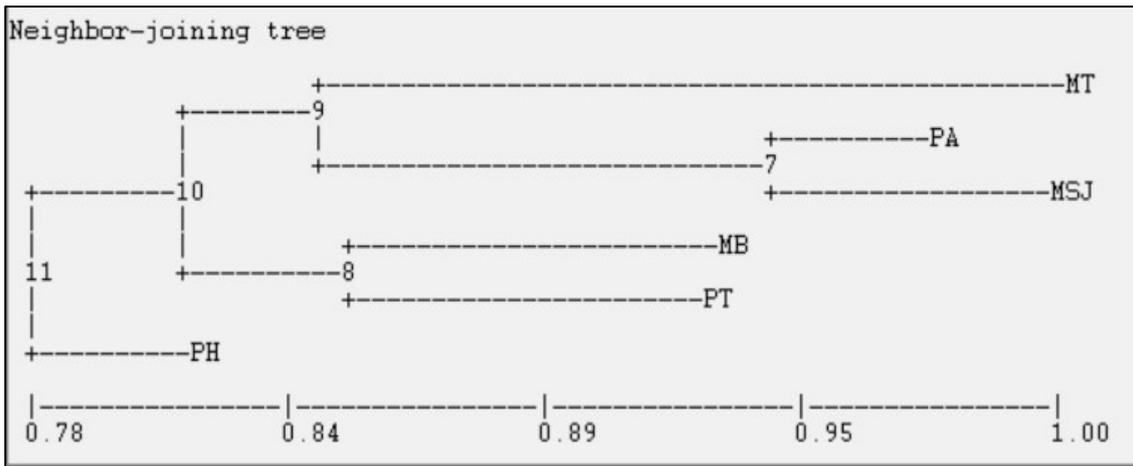


Figura 10. Resultado da distância genética (Neighbour-joining) do complexo *S. goniorachis* através do software GDA. MT -Morro do Tucum, PA - Pão de Açúcar, MB - Morro da Babilônia, PT - Pico da Tijuca, MSJ – Morro São João, PH – Pedra do Hime.

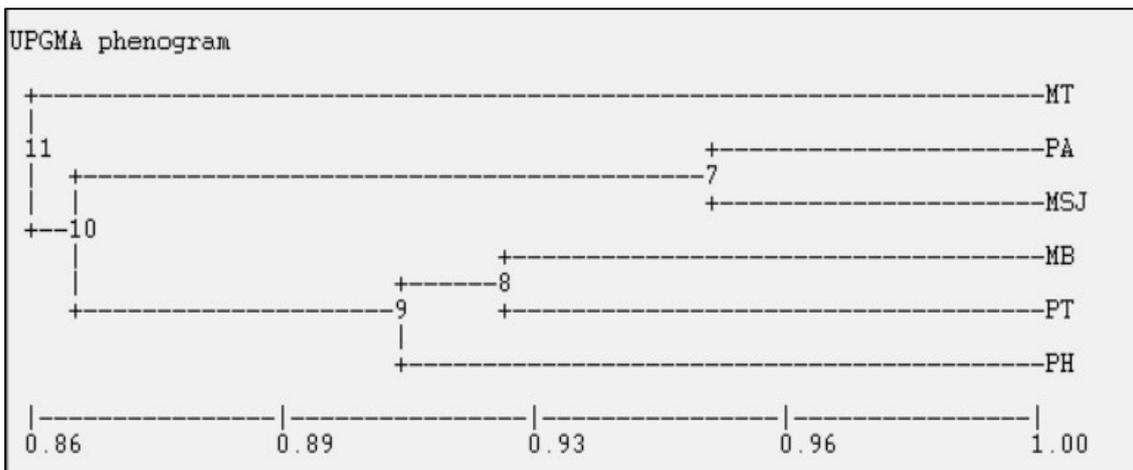


Figura 11. Resultado da distância genética (UPGMA) do complexo *S. goniorachis* usando o software GDA. MT -Morro do Tucum, PA - Pão de Açúcar, MB - Morro da Babilônia, PT - Pico da Tijuca, MSJ – Morro São João, PH – Pedra do Hime.

2.3.3 Implicações taxonômicas

Tanto os resultados morfológicos quanto os genéticos revelaram que *S. brassicoides*, *S. costae* e *S. francae* são unidades evolutivas independentes, portanto, compondo espécies diferentes. Em *S. goniorachis*, as análises morfológicas e genéticas evidenciaram dois grupos distintos, um grupo com as populações de Pão de Açúcar - PA e Morro São João – MSJ, e outro com as populações de Morro da Babilônia - MB e Pico da Tijuca - PT, indicando se tratarem de duas espécies diferentes. As principais características que distinguem as espécies do complexo *S. goniorachis* avaliadas neste estudo como a área de ocorrência, postura longitudinal, cor e distribuição de tricomas na lâmina foliar, além do tipo de inflorescência, cor das brácteas florais e da pétala foram agrupadas na tabela 10 e fig. 12. Nesse sentido, realizamos uma sinopse taxonômica das espécies do complexo *S. goniorachis*, acompanhada de uma chave para identificação das espécies e comentários. Além disso, incluímos a descrição morfológica de *Stigmatodon carioca sp. nov.*, a nova espécie encontrada nas localidades de Pão de Açúcar - PA e Morro São João - MSJ, uma vez que o tipo nomenclatural de *S. goniorachis* possui as características morfológicas das populações do Pico da Tijuca e do Morro da Babilônia.

Tabela 10. Principais características para distinguir espécies do complexo *Stigmatodon goniorachis*.

Caracteres	<i>S. brassicoides</i>	<i>S. carioca sp. nov.</i>	<i>S. costae</i>	<i>S. francae</i>	<i>S. goniorachis</i>
Ocorrência	Pedra da Gávea	Pão de Açúcar, Morro São João	Morro do Tucum	Pedra do Hime	Morro da Babilônia, Pico da Tijuca
Postura longitudinal da lâmina	Retorcida	Revoluta	Convoluta	Convoluta	Convoluta
Cor da lâmina	Verde-cinéreo/verde-vináceo, com máculas vináceas	Verde	Verde-lúcido com uma linha roxa fina na margem	Verde-cinéreo/verde-vináceo	Verde-vináceo
Distribuição de tricomas na folha	Ambas as faces, mais densos na face abaxial	Ambas as faces, distribuídas em faixas transversais	Na bainha em ambas as faces	Em toda a lâmina, em ambas as faces	Em toda a lâmina, em ambas as faces
Tipo de inflorescência	Simplex	Simplex	Simplex	Composta	Simplex ou raramente composta
Postura e posição da inflorescência	Ereto, subereto	Sigmoide, subereta a patente	Sigmoide, subereta a patente	Sigmoide, patente a pendente	Sigmoide, subereta a pendente

Cor da bráctea floral	Vinácea	Verde, ápice vináceo	Verde, ápice vináceo	Verde	Vinácea
Cor da pétala	Branca	Branca	Branca	Branca- esverdeada	Branca- esverdeada
Forma dos apêndices da pétala	Ápice agudo	Oboval, ápice irregularmente bidentado	Oboval, subsimétrico, ápice fimbriado	Oboval, ápice acuminado a irregularmente acuminado- dentado	Oboval, ápice irregularmente bidentado

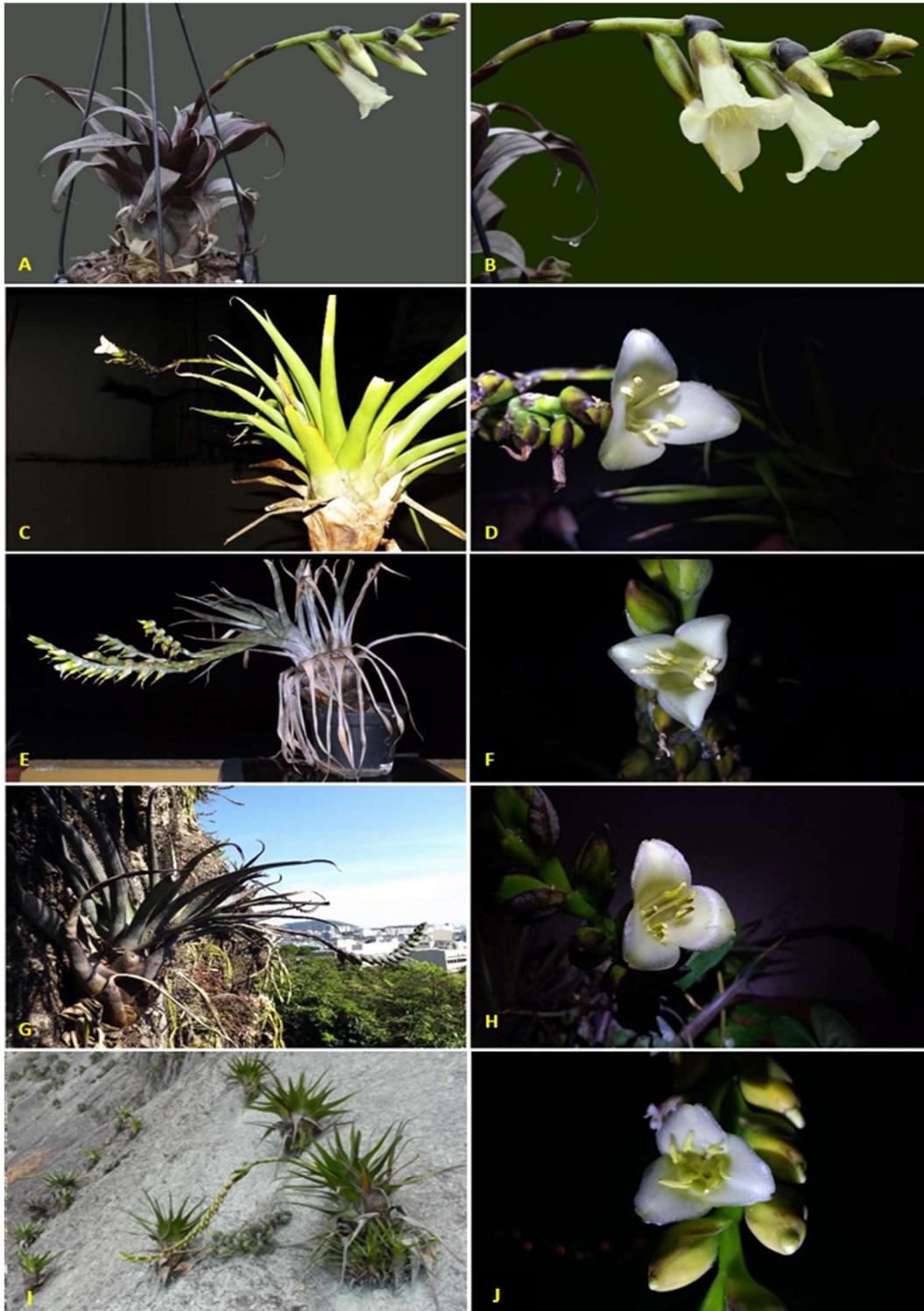


Figura 12. Espécies de *Stigmatodon* da região metropolitana do Rio de Janeiro. (A, B) *S. brassicoides*, (C, D) *S. costae*, (E, F) *S. francae*, (G, H), *S. goniorachis*, (I, J), *S. carioca* sp. nov. (Imagens: Arquivo pessoal e Peter Tristram).

2.4 Discussão

As análises morfométricas evidenciaram diferenças morfológicas claras entre as quatro espécies que compõem o complexo *Stigmatodon goniorachis* (*S. brassicoides*, *S. costae*, *S. francae*, *S. goniorachis*), além de sinalizar a presença de uma nova espécie aqui descrita, *Stigmatodon carioca sp. nov.* A diferenciação entre as populações provavelmente é influenciada por fatores microclimáticos de cada local de ocorrência das espécies (Sultan, 2003; Valladares *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2009). Por exemplo, as populações de *S. carioca sp. nov.* ocorrem no Pão de Açúcar e no Morro São João na face sul dos *inselbergs*, já as populações de *S. goniorachis* no Morro da Babilônia e Pico da Tijuca, são localizadas na face norte destes *inselbergs*. As principais diferenças entre as populações de *S. goniorachis* e *S. carioca sp. nov.* que são localizadas em diferentes faces de ocorrência são melhor evidenciadas *in loco*, nos indivíduos vivos. Desta forma é possível observar uma clara distinção na postura longitudinal, cor e distribuição de tricomas na lâmina foliar, cor das brácteas florais, e cor das pétalas (fig. 12). As diferenças observadas em faces distintas de ocorrência em cada *inselberg* parecem ser diretamente influenciadas pela luz solar. As populações localizadas na face norte (*S. goniorachis*) recebem maior incidência de radiação do sol ao longo de todo o ano, em contraste com a face sul (*S. carioca sp. nov.*), que recebe incidência de radiação solar menor ao longo do ano. Este fator pode desencadear vários efeitos morfológicos e anatômicos nos tecidos das plantas, com finalidade de limitar os danos causados pela incidência solar (Dinakar *et al.*, 2012). Além disso, podem afetar as características fisiológicas, o que pode influenciar na troca de energia entre planta e ambiente, afetando os processos fotossintéticos, de crescimento, e alterando a estrutura genética (Jones, 1994; Begon *et al.*, 2006). A influência desses diferentes fatores ambientais, agindo de forma distinta e isolada em cada *inselberg*, pode ter colaborado para o surgimento das variações morfológicas que observamos em nossas análises.

Espécies ocorrentes em *inselbergs* geralmente apresentam características peculiares como distribuição restrita e ocorrência em ambientes fragmentados (De Paula *et al.*, 2016). Tais características podem desencadear eventos evolutivos como a deriva genética, efeito fundador, e com isso o endocruzamento pode se tornar mais frequente nas

populações ocorrentes neste tipo de ambiente (Frankham *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2011; Millar *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2014; Tapper *et al.*, 2014; Hmeljevski *et al.*, 2017). Entre as quatro espécies de *Stigmatodon* da região metropolitana do Rio de Janeiro, apenas *S. goniorachis* e *S. carioca sp. nov.* ocorrem em mais de um *inselberg*, sendo as demais de ocorrência em um único *inselberg*. Com isso, as localidades onde estão distribuídas as populações de *S. brassicoides*, *S. carioca sp. nov.*, *S. costae* e *S. francae*, podem apresentar baixos níveis de diversidade genética, alta estruturação populacional e altos níveis de endocruzamento devido ao limitado fluxo gênico.

Ao compararmos as análises das espécies que compõem o complexo *S. goniorachis* observamos que *S. costae* no Morro do Tucum (MT) no Parque Estadual da Serra da Tiririca é a que apresenta os menores índices de diversidade genética ($H_e = 0.550$). Apesar deste parque abranger uma extensa área de ca. 3500 ha (INEA, 2015), a população de *S. costae* possui ocorrência conhecida em um único local e é relativamente pequena em comparação às demais populações das outras espécies do complexo *S. goniorachis*. Além disso, está localizada somente em uma vertente e nas partes baixas do Morro do Tucum – Costão de Itacoatiara, muito próximo à área urbana, podendo ser alvo de impactos antrópicos como, por exemplo, incêndios e/ou remoção de indivíduos para a abertura de vias de escalada, o que pode afetar os seus níveis de diversidade genética. Apesar de tais características e pelo parque ter sofrido com impactos ambientais iniciados no período colonial (Pontes, 1987), o mesmo ainda manteve boa parte do seu patrimônio genético conservado com espécies endêmicas como *S. costae*.

Em referência a única localidade de *S. francae* conhecida até o momento, Pedra do Hime (PH), esta população foi a que apresentou os maiores índices de diversidade genética com ($H_e = 0.762$) dentre todas as espécies deste estudo. Este local está inserido, na região de Jacarepaguá em um *inselberg* localizado ao lado da mineradora Tamoio Mineração S/A. Tal fato poderia contribuir e/ou impactar significativamente a população de *S. francae*, principalmente pela poluição causada por este empreendimento. Porém, este *inselberg* está situado em área de difícil acesso, em terreno acidentado, dentro dos limites do Parque Estadual da Pedra Branca, na fronteira com a mineradora. A inserção

deste local em uma unidade de conservação, aliado ao difícil acesso humano pode ter contribuído substancialmente na preservação e manutenção da integridade desta população (Couto *et al.*, 2020), que evidenciou os maiores índices de diversidade genética em nossas análises.

A respeito das populações de *S. goniorachis*, no Morro da Babilônia (MB) e no Pico da Tijuca (PT) ambas apresentaram parâmetros genéticos muito próximos e equiparáveis como riqueza alélica ($A_r = 4.875$ e 4.878), respectivamente. Entretanto a heterozigosidade observada ($H_o = 0.557$) em Pico da Tijuca (PT) foi a menor e o índice de fixação ($F_{is} = 0.144$, $P < 0.01$) foi o maior entre todas as populações analisadas. Esta população está inserida no ponto mais alto, distante e isolado das demais localidades de ocorrência desta espécie. Estas características geográficas e ambientais podem ter contribuído para os valores de heterozigosidade observada (H_o) e do índice de fixação (F_{is}) encontradas nessa população.

Os valores de todos os parâmetros genéticos encontrados nas análises de *S. carioca sp. nov.* foram próximos às demais espécies do complexo *S. gonirachis*. Entretanto os valores do índice de fixação (F_{is}) nas localidades de Pão de Açúcar (PA) ($F_{is} = 0.006$) e Morro São João (MSJ) ($F_{is} = 0.039$) foram os menores entre todas as populações analisadas. Essas duas localidades estão muito próximas geograficamente (ca. de 3Km), e isso pode contribuir para um maior fluxo gênico entre essas populações, o que pôde ter levado aos valores do índice de fixação (F_{is}) que encontramos em nossas análises.

Todas as localidades de *S. goniorachis*, e de *S. carioca sp. nov.* com exceção do Pico da Tijuca (PT) estão muito próximas à área urbana e cercada por densa ocupação humana, o que pode contribuir para impactos ambientais decorrentes do crescimento desordenado, pela poluição, abertura de novas vias de escalada, dentre outros. Entretanto, todas essas localidades estão inseridas em algum tipo de unidade de conservação, seja ela municipal, estadual ou federal. Além disso, o acesso a esses locais geralmente é dificultado pelas condições do terreno, o que pode ter contribuído para manutenção dos índices de diversidade genética observados nas populações do presente estudo.

Em relação aos padrões de diversidade genética nas quatro espécies, os valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) são similares a outras espécies de Bromeliaceae rupícolas e de *inselbergs* da Floresta Atlântica, que apresentaram heterozigosidade observada variando entre $H_o = 0.206 - 0.509$, e heterozigosidade esperada variando entre $H_e = 0.217 - 0.670$ (Barbará *et al.*, 2007a; Lexer *et al.* 2016; Pereira *et al.*, 2017; Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2017; Manhães *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2012; Pinangé *et al.*, 2019; Hirsh *et al.*, 2019). Também é relatado em afloramentos rochosos com formação de ferro ocorrência de heterozigosidade observada variando entre $H_o = 0.130 - 0.475$, e heterozigosidade esperada variando entre $H_e = 0.255 - 0.620$ (Lavor *et al.*, 2014; Ruas *et al.*, 2020). Resultados semelhantes também foram encontrados em estudos com espécies de Bromeliaceae ocorrentes em outros tipos de ambientes, onde as heterozigosidades observada e esperada variam entre $H_o = 0.241 - 0.680$ e $H_e = 0.188 - 0.780$ respectivamente (Palma-Silva *et al.*, 2009; Zanella *et al.*, 2011; Goetze *et al.*, 2015; Goetze *et al.*, 2016; Todeschini *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2018; Godoy *et al.*, 2019; Loh *et al.*, 2019), todas de ocorrência na Floresta Atlântica. Padrões similares também foram observados em espécies ocorrentes fora do Brasil, como na região Andina, que revelaram heterozigosidades observada e esperada entre $H_o = 0.089 - 0.325$ e $H_e = 0.143 - 0.402$ respectivamente (Tumi *et al.*, 2019., Wöhrmann *et al.*, 2019). Da mesma forma, em florestas da América Central *Aechmea mariaae-reginae* H. Wendl. apresentou heterozigosidades observada e esperada entre $H_o = 0.540$ e $H_e = 0.638$, respectivamente (Cascante-Marín *et al.*, 2019). Em todos os estudos citados acima e da mesma forma no presente trabalho, a heterozigosidade observada (H_o) foi menor que o esperado (H_e) para o EHW. Em nossas análises isto foi observado em cinco das seis populações estudadas, relacionando ao déficit de heterozigotos ou excesso de homozigotos. Estes resultados podem ser atribuídos a autofecundação, ou aos cruzamentos entre indivíduos aparentados, o que pode ser explicado pela distribuição espacial agregada dos indivíduos destas espécies no *inselberg* (Barbará *et al.*, 2009).

Comparando o número de alelos privados evidenciados pelos oito *loci* microssatélites nucleares, observamos uma diferença no número de alelos exclusivos nas diferentes populações do complexo *S. goniorachis*. O número de alelos privados pode

influenciar diretamente a riqueza alélica de cada população, e indivíduos portadores de alelos exclusivos podem atuar como fonte de variabilidade com a introdução destes alelos em outras populações com menores índices de diversidade genética (Melo, 2012). Desta forma, populações detentoras de alelos únicos tornam-se importantes na manutenção dos níveis de heterozigosidade, podendo disseminar estes alelos para outras populações (Melo, 2012). O aumento do nível de riqueza alélica junto ao nível de heterozigosidade pode ser observado neste estudo, principalmente na população de *S. francae* da Pedra do Hime, a qual apresentou os maiores valores de riqueza alélica (A_r) e de heterozigosidade esperada (H_e), em contraste com a população de *S. costae* no Morro do Tucum (MT).

Níveis relativamente altos de diversidade genética foram encontrados nas populações de *Stigmatodon* em estudo. A riqueza alélica (A_r) e a heterozigosidade observada (H_o) foram relativamente maiores quando comparadas com outras espécies de Bromeliaceae também avaliadas por microssatélites (Zanella *et al.*, 2012; Lexer *et al.*, 2016; Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Hirsh *et al.*, 2019; Mota *et al.*, 2019; Pinangé *et al.*, 2019; Ruas *et al.*, 2020). Portanto, apesar das espécies de *Stigmatodon* apresentarem uma distribuição extremamente restrita e pontual, foram observados moderados a altos níveis de diversidade, que provavelmente são influenciados pela história de vida destes táxons. Os níveis de riqueza alélica revelam informações importantes referentes à história demográfica das populações em suas diferentes localidades, a partir destes resultados é possível inferir se estes locais passaram, por exemplo, por algum evento de gargalo genético (efeito *bottleneck*) (Melo, 2012). Estes eventos de gargalos genéticos são diretamente associados com os efeitos de deriva genética, que podem ocorrer em populações constituídas por poucos migrantes, que carregam consigo apenas uma parte de toda a variação genética de populações maiores (Sánchez, 2008). Além disso os gargalos genéticos levam ao aumento da endogamia, elevando os níveis de homozigose possibilitando a fixação de alelos deletérios raros, podendo afetar os processos fisiológicos de crescimento e reprodução das espécies (Hansson & Westerberg, 2002; Povh *et al.*, 2005; Panarari, 2006). Diante deste cenário, os valores obtidos neste estudo com as análises de reduções recentes no tamanho populacional (efeito *bottleneck*), não revelaram valores significativos nas populações das

quatro espécies analisadas ($P > 0.05$), indicando que não houve efeito gargalo nestes locais. Nesse sentido, o presente estudo sugere que apesar de isolados, esses ambientes podem preservar a biodiversidade, e também abrigar espécies com moderados a altos níveis de diversidade genética e com baixos níveis de endocruzamento (Hmeljevski *et al.*, 2017; Manhães *et al.*, 2019; Mota *et al.*, 2019), destacando a necessidade de mais estudos deste tipo nesses ambientes.

As espécies de *Stigmatodon* do presente estudo investem em mecanismos reprodutivos sexuais e assexuais (observação pessoal), características que podem contribuir para a manutenção da diversidade genética. A reprodução sexuada geralmente é a principal fonte de variabilidade genética nas populações, promovendo uma maior diversidade genética (Hamrick & Godt, 1996; Nybom, 2004; Glémin *et al.*, 2006). Entretanto, a reprodução clonal é conhecida por aumentar o tempo de geração, acarretando a sobreposição de várias gerações, o que pode diminuir ou retardar a perda da diversidade genética através da deriva genética e minimizar o endocruzamento (Orive, 1993; Young *et al.*, 1996; Esselman *et al.*, 1999; Cavallari *et al.*, 2006; Goetze *et al.*, 2015; Loh *et al.*, 2015). Isto foi evidenciado nas populações de nosso estudo, que apesar de estarem isoladas e com distribuição extremamente restrita, os diferentes mecanismos reprodutivos podem ter contribuído para os níveis de diversidade genética encontrados em nossos resultados.

A capacidade dos sistemas de dispersão e reprodução são fatores importantes na determinação da diversidade e estrutura genética populacional das plantas. Estudos prévios sugerem que uma diferença significativa entre duas populações ocorre quando a taxa de diferenciação (por exemplo R_{st}) é maior de 0,25 (Slatkin, 1987; Han *et al.*, 2007). No presente estudo, os dados para *Stigmatodon* sugerem uma distinção entre as seis populações das quatro espécies, uma vez que a diferenciação genética indicada por R_{st} foi de 0.274. Valores semelhantes de estruturação genética populacional também foram observados em outras espécies de Bromeliaceae ocorrentes em *inselbergs* como em *Alcantarea imperialis* e *A. glaziouana* (Leme) J.R.Grant (Barbará *et al.*, 2009), em *Pitcairnia albiflos* Herb. e *P. staminea* Lodd. (Palma-Silva *et al.*, 2011) em *Encholirium*

horridum L.B.Sm. (Hmeljevski *et al.*, 2017), em *Dyckia choristaminea* Mez e *D. hebdingii* L.B.Sm. (Hirsh *et al.*, 2019), e em *P. corcovadensis* Wawra (Mota *et al.*, 2019). Entretanto, quando comparada as populações do complexo *S. goniorachis* duas a duas, os menores valores de R_{st} foi entre as populações de *S. goniorachis*, PA e MSJ (aqui descrita como *S. carioca sp. nov.*) com $R_{st} = 0.029$ e entre MB e PT $R_{st} = 0.119$, indicando uma possível conexão entre essas populações. Esses resultados também foram evidenciados na análise bayesiana de agrupamento, que revelou a formação de quatro grupos, um de *S. costae*, um de *S. francae*, um de *S. goniorachis* e um de *S. carioca sp. nov.* A AMOVA também indicou que parte da diversidade é distribuída entre populações dentro dos grupos, apoiando a divisão em quatro grupos distintos.

Conquanto as populações em estudo de *Stigmatodon* estarem localizadas próximas umas das outras, o modelo de isolamento por distância não foi observado. A análise de correlação entre distância geográfica e genética, não foi significativa com $r = 0.044$ $P < 0.01$, sugerindo que o isolamento genético observado entre as populações não é correlacionado com as distâncias geográficas. Estes resultados são corroborados pela análise de fluxo gênico indireto, que revelou um $N_m = 0.662$, indicando um baixo fluxo gênico médio entre estas populações. Valores similares de fluxo gênico indireto foram observados em outras Bromeliaceae de *inselbergs* como no gênero *Alcantarea* com N_m variando entre 0.071 a 0.730 (Barbará *et al.*, 2007a; Lexer *et al.*, 2016) e também em algumas populações da espécie *Encholirium magalhaesii* L.B.Sm. com N_m ficando entre 0.09 a 0.810 (Gonçalves-Oliveira *et al.*, 2020). Considerando o fluxo gênico indireto no presente estudo, a média de fluxo gênico encontrado foi abaixo do valor considerável satisfatório para a coesão das populações, que é acima de $N_m = 1$ (Wright, 1921). Contudo, comparando as populações duas a duas, as populações de *S. carioca sp. nov.* em Pão de Açúcar (PA) e Morro São João (MSJ) tiveram um $N_m = 8.370$ e de *S. goniorahis* em Morro da Babilônia (MB) e Pico da Tijuca (PT) um $N_m = 1.850$. Estes resultados reforçam os padrões encontrados na distância genética de Nei (1978) quando comparando as populações duas a duas tanto no modelo UPGMA quanto no Neighbor-Joining. Além disso, corroboram com as análises de estrutura genética e bayesiana, indicando um fluxo gênico satisfatório para manter a coesão entre essas populações.

Apesar das espécies em estudo apresentarem sementes plumosas com características de boa dispersão pelo vento, este fato não foi observado de forma sistemática em todas as populações do complexo *S. goniorachis*. Este padrão também foi observado em espécies do gênero *Alcantarea*, da mesma subfamília Tillandsioideae, e que apresentam sementes com as mesmas características morfológicas (sementes comosas adaptadas à dispersão pelo vento). Muitas espécies de *Alcantarea* são restritas a um ou dois *inselbergs*, mesmo inseridas em áreas com alta concentração deste tipo de afloramento rochoso (Versieux & Wendt, 2006; Versieux & Wanderley, 2015; De Paula *et al.*, 2016). Possivelmente as sementes destes gêneros apresentam dificuldade de germinação nos ambientes xéricos dos *inselbergs* que apresentam baixa disponibilidade hídrica e elevadas temperaturas. Isto foi relatado por Paula & Silva (2001), Duarte *et al.* (2010) e Loh *et al.* (2015) os quais observaram que fatores internos como a viabilidade e longevidade das sementes, e por fatores externos como a falta de água, temperatura adequada e a luminosidade podem implicar na redução da porcentagem de germinação ou morte de plântulas recém germinadas.

Restrições na germinação de sementes de Bromeliaceae influenciadas pela temperatura também foi observado por Alfaya (2010), em *Alcantarea nahoumii* e por Lima (2012) em *A. glaziouana*. Segundo Alfaya (2010) as sementes de *A. nahoumii* apresentam restrição para germinação em temperaturas superiores a 35°C, sendo que a temperatura para obtenção de plântulas viáveis é entre 20°C a 25°C. De acordo com Lima (2012) em *A. glaziouana* houve redução na germinação de sementes em temperaturas superiores a 40°C, com temperatura para obtenção de plântulas viáveis em torno de 25°C. Este tipo de restrição na germinação das sementes influenciada pela temperatura, possivelmente pode ocorrer nas espécies do complexo *S. goniorachis* em estudo, sendo que estas espécies estão inseridas em *inselbergs* que podem alcançar temperaturas de até 60°C e com reduzida disponibilidade de substrato para fixação das sementes (Pontes, 1987; Lima, 2012). Além disso, estas espécies estão inseridas em vertentes muito íngremes, o que pode contribuir para que as sementes sejam arrastadas com a ocorrência de chuvas torrenciais antes mesmo de se fixarem, levando a uma redução de plantas jovens, como relatado por Hernandez *et al.* (1999) para *Tillandsia guatemalensis* L.B.Sm.

Apesar de não haver dados sobre o sistema reprodutivo de *Stigmatodon* a autocompatibilidade é predominante no gênero *Vriesea* (Siqueira-Filho, 2003; Matallana *et al.*, 2010), seu grupo irmão (Barfuss *et al.*, 2016; Kessous *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2019). *Stigmatodon* apresenta flores adaptadas à polinização por morcegos com flores campanuladas, de coloração branca a branco-esverdeada, com grande produção de néctar e odor que lembra alho (Barfuss *et al.*, 2016; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2019; Neves *et al.*, 2020). Os morcegos são polinizadores importantes de diversas espécies de plantas tropicais, incluindo as Bromeliaceae (Tschapka e Dressler, 2002; Fleming *et al.*, 2009). Estes polinizadores são altamente eficientes, que transmitem grandes quantidades de pólen, em contraste com a maioria dos visitantes florais (Muchhala & Thomson, 2010). Entretanto, em suas visitas, os morcegos apresentam uma baixa constância floral devido ao seu hábito de visitar flores de diversas espécies em uma única noite, com isso, produzindo cargas de pólen misto para estigmas receptivos (Fleming *et al.*, 2005; Muchhala *et al.*, 2008). Além disso, esses polinizadores costumam ingerir pólen e, devido ao seu hábito alimentar diversificado, entrando com contato com variadas plantas durante seu forrageamento (Heithaus *et al.*, 1975), podem acabar limitando sua eficiência na polinização de algumas espécies (Fleming & Sosa, 1994).

Populações de espécies quiropterófilas simpátricas, ou que estão localizadas próximas umas das outras, empregam estratégias para minimizar o compartilhamento de morcegos polinizadores locais. Dentre estas estratégias são incluídas: floração escalonada (Sazima *et al.*, 1999; Lobo *et al.*, 2003; Cummings *et al.*, 2014), diferentes tempos de ântese durante a noite (Howell, 1977), diferenças na morfologia floral, e deposição de pólen no corpo do morcego (Tschapka *et al.*, 2006; Muchhala & Potts, 2007; Muchhala, 2008; Muchhala & Thomson, 2012; Stewart & Dudash, 2016, 2017). Outros mecanismos também são utilizados, como um cronograma na produção e/ou diferentes composições energéticas de néctar, que são aspectos importantes nas estratégias reprodutivas das plantas (Heithaus *et al.*, 1975; Fleming *et al.*, 1996; Tschapka, 2004; Truchado *et al.*, 2008; Nepi, 2017; Parachnowitsch *et al.*, 2019). Esta dinâmica de produção de néctar é cercada por particularidades no padrão de secreção, e em interrupções e/ou possíveis reabsorções, e esses fatores podem refletir diretamente na disponibilidade desse recurso

para os polinizadores (Agostini *et al.*, 2014). Concomitantemente a variabilidade na produção de néctar pode ocorrer em espécies da mesma família, como também em flores do mesmo indivíduo, e pode estar correlacionado a fatores ambientais, ecológicos e morfo-anatômicos (Galletto & Bernardello, 2004, 2005; Agostini *et al.*, 2011, Zambon *et al.*, 2019). Outro traço importante é que a composição do néctar pode ser modificada em curtos espaços de tempo, como na reposição de néctar após as visitas, o que pode alterar os níveis de açúcar secretado por uma flor, afetando diretamente as preferências do polinizador, pois esses açúcares são sua principal fonte de energia (Heinrich, 1975; Galletto & Bernardello, 2004). Essa variabilidade qualitativa e quantitativa na produção de néctar, também pode influenciar o comportamento de forrageamento do polinizador, afetando diretamente na transferência de pólen e conseqüentemente na reprodução das plantas (Zimmerman, 1983; Agostini *et al.*, 2011; Pyke, 2016). Além disso, algumas espécies de Bromeliaceae polinizadas por morcegos podem usar visitantes diurnos como polinizadores secundários, como nos gêneros *Billbergia*, *Encholirium*, *Guzmania*, *Pitcairnia* e *Tillandsia* (Krömer, 2003; Christianini *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2015; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2016; Queiroz *et al.*, 2016; Silva Jorge *et al.*, 2018), sendo as aves os polinizadores secundários mais frequentes. No entanto algumas espécies de abelhas são frequentemente visitantes alternativos (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2019). Isto pôde ser evidenciado em indivíduos em cultivo de *S. costae* em nosso estudo. Nesses indivíduos foram observados visitantes diurnos de *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) polinizando (com produção de sementes) esta espécie que mantinham suas flores abertas até a metade da manhã (observação pessoal).

Outros fatores que podem influenciar o comportamento dos polinizadores são as condições ambientais de cada local. Borges *et al.* (2016) indicam que espécies de plantas que vivem em ambientes com baixa disponibilidade hídrica têm maior probabilidade de desenvolver antese crepuscular ou noturna como estratégia para reduzir a perda de néctar através da evaporação. Este fato também foi evidenciado por Sánchez-LaFuente *et al.*, (2005), os quais sugerem que as condições ambientais têm um efeito sobre os padrões de presença e atividade de polinizadores locais. Levando em consideração os fatores citados acima, referentes ao comportamento dos polinizadores e das condições ambientais de

cada localidade, podemos sugerir que as espécies do complexo *S. goniorachis* do presente estudo podem não compartilhar os mesmos polinizadores. Isso pode ser evidenciado principalmente nas populações de *S. goniorachis* e *S. carioca sp. nov.* Estas duas espécies têm populações localizadas em diferentes vertentes dos *inselbergs*: no Pão de Açúcar (PA) e no Morro São João (MSJ) voltados para face sul e Morro da Babilônia (MB) e Pico da Tijuca (PT) voltados para face norte. Estes locais têm diferentes condições ambientais, sendo que a parte sul fica praticamente na sombra, recebendo pouca incidência do sol, em contraste com a face norte, que recebe incidência solar durante quase todo o dia, durante a maior parte do ano. Estas condições ambientais podem influenciar o cronograma de antese noturna (Howell, 1977), a composição energética do néctar (Heithaus *et al.*, 1975, Fleming *et al.*, 1996, Tschapka, 2004) minimizando o compartilhamento e o comportamento de morcegos polinizadores locais. Além disso, não se pode descartar a polinização de visitantes diurnos alternativos (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2019), como as abelhas observadas nos indivíduos de *S. costae* de nosso estudo (observação pessoal). Estes fatores podem ter contribuído para os resultados genéticos encontrados em nosso estudo, principalmente nas populações de *S. goniorachis* e *S. carioca sp. nov.* Essas localidades evidenciaram resultados muito distintos, principalmente quando levamos em consideração a distância e a face de ocorrência, o que pode alterar a interação entre os possíveis polinizadores. Provavelmente as condições ambientais de cada face levaram para os resultados de baixo fluxo gênico e conseqüentemente alta estruturação genética populacional entre essas populações próximas.

Além dos cenários citados acima, não se pode descartar no caso de compartilhamento de polinizadores, as possíveis barreiras pré-zigóticas que impedem que a fecundação ocorra e/ou pós-zigóticas onde ocorre fecundação, mas com baixo nível de sobrevivência, ou com desenvolvimento de indivíduos estéreis, o que pode levar ao isolamento reprodutivo total (Levin, 1971; Kay, 2006). Além disso, as interações entre plantas e polinizadores podem ocasionar em diferenças adaptativas dos traços florais, contribuindo para o desenvolvimento do isolamento reprodutivo (Grant, 1981). Tais mecanismos atuam para garantir de alguma forma, que espécies proximamente

relacionadas que ocorrem em áreas adjacentes, permaneçam como entidades distintas (Grant, 1981; Coyne & Orr, 2004). Espécies relacionadas de Bromeliaceae que ocorrem em habitats similares e em regiões próximas, como observado nas espécies do complexo *S. goniorachis*, podem apresentar semelhanças florais, com períodos de floração sobrepostos, compartilhando polinizadores, e com isso aumentando a transferência de pólen heteroespecífico (Martinelli, 1994; Wendt *et al.*, 2001, 2008; Araújo *et al.*, 2004; Siqueira-Filho & Leme, 2006; Barbará *et al.*, 2007b; Versieux & Wanderley, 2015). A admissão de pólen heteroespecífico de espécies relacionadas pode reduzir a aptidão do conjunto total de sementes (Marshall *et al.*, 2002, Widmer *et al.*, 2009). Esta perda de aptidão em consequência do recebimento de pólen heteroespecífico pode levar a barreiras reprodutivas ainda mais fortes (Jain, 1976; Geoffrey, 1992; Marshall *et al.*, 2002; Rieseberg & Willis, 2007). Essas barreiras atuam após o contato do polinizador com a flor, durante a germinação do pólen e do crescimento do tubo polínico, ou mesmo após a fertilização no desenvolvimento das sementes (Rieseberg & Willis, 2007; Matallana *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017). Este tipo de bloqueio é mais contundente quando as barreiras à polinização (escalonamento de ântese e diferentes tipos de polinizadores) não atuam satisfatoriamente, ou mesmo quando ocorre o compartilhamento de pólen heteroespecífico (Wendt, 1999; Neri *et al.*, 2017). Tais características foram observadas por Cavalcante *et al.* (2020), onde a coexistência de duas espécies próximas de Bromeliaceae foi facilitada pela presença de barreiras pré-zigóticas com a incongruência dos tubos polínicos, possivelmente causados pela rápida divergência das interações entre pólen e pistilo nessas espécies. Além dessas características, a autofecundação pode funcionar como um tipo de barreira, promovendo o isolamento reprodutivo entre espécies congêneres (Levin, 1971). Isso pode ocorrer principalmente quando as condições de cruzamento são desvantajosas como a baixa dispersão causada pela distância, baixa densidade de indivíduos para atração de polinizadores, ou condições ambientais desfavoráveis, o que pode favorecer a autofecundação através da seleção natural (Barret, 2003), ou mesmo pela competição por polinizadores (Levin, 1972; Jain, 1976; Motten, 1982; Charlesworth, 2006). Estes fatores foram observados por Wendt *et al.* (2002) em três espécies congêneres de Bromeliaceae do gênero *Pitcairnia* que ocorrem na mesma

área de distribuição do complexo *S. goniorachis* do nosso estudo. Tanto as barreiras pós-zigóticas com a admissão de pólen heteroespecífico reduzindo a aptidão de sementes, como barreiras pré-zigóticas entre pólen e pistilo, e também processos de autofecundação podem estar ocorrendo nas populações estudadas do complexo *S. goniorachis*, o que pode ter influenciado nos padrões de estruturação genética observados.

Apesar da distribuição restrita das espécies de *Stigmatodon* em estudo, esses táxons exibiram moderada-alta diversidade dentro das populações, talvez como consequência da reprodução sexual e assexuada ocorrendo simultaneamente. Além disso, a formação dos grupos dentro do complexo *S. goniorachis*, pode estar sendo influenciado por fatores ambientais, considerando que algumas populações estão voltadas para o sul, e outras voltadas para o norte. Estes fatores ambientais podem afetar os processos fotossintéticos, de crescimento e alterar a estrutura genética (Jones, 1994; Begon *et al.*, 2006). Além destes fatores, as características de germinação de sementes, do néctar floral, dos polinizadores, de barreiras pré e pós-zigóticas e de possíveis autofertilizações nos diferentes ambientes de ocorrência das espécies estudadas, podem estar afetando e/ou influenciando a estrutura genética dessas populações. Além dessas características, a distância média de fluxo de pólen pode ocorrer em pequenas distâncias como relatado por Hmeljevski *et al.* (2015). Desta forma, estudos com foco na fisiologia, reprodução, e biologia floral destes táxons são essenciais para a compreensão dos efeitos da diversidade e estrutura genética populacional, e na sobrevivência e no potencial evolutivo dessas espécies.

Apesar das espécies do complexo *S. goniorachis* de nosso estudo estarem situadas em algum tipo de unidade de conservação, todas foram avaliadas em algum grau de ameaça de acordo com a IUCN (Couto *et al.*, in prep.). Além disso, Hoban *et al.* (2020) relata a importância de avaliar e incluir parâmetros de diversidade genética tanto para espécies domesticadas, quanto para espécies naturais/nativas na política de conservação global (por exemplo, CBD – Convenção sobre Diversidade Biológica). Portanto, nossos resultados contribuem na compreensão dos níveis e padrões de diversidade morfológica e genética do complexo *S. goniorachis*. Estes dados podem nortear e auxiliar no

desenvolvimento de estratégias de conservação dessas espécies ameaçadas dos *inselbergs* da Floresta Atlântica.

2.5 Sinopse taxonômica e descrição da espécie nova

2.5.1 *Stigmatodon* Leme, G.K.Br. & Barfuss, Phytotaxa 279(1): 56. 2016. Tipo: *Vriesea harrylutheri* Leme & G.K. Br.

Diagnose: Ervas exclusivamente epífitas com folhas xeromórficas ou semi-xeromórficas, lâminas triangulares, coriáceas, com indumento lepidoto denso; flores campanuladas com antese noturna, estigma tubolaciniado.

Ervas epífitas, caule curto ou muito longo, propagando-se por brotações basais ou imbricadas nas axilas das folhas ou por brotações adventícias na parte mais velha do caule. **Roseta** infundibuliforme, raramente utriculiforme ou fasciculada. **Folhas** triangulares ou raramente estreito-lineares e linguladas, eretas, suberetas ou reflexas, coriáceas a subcoriáceas, densamente lepidotas na maioria das espécies. **Inflorescência** simples ou composta, reta ou sigmoide, ereta, subereta, patente a pendente. **Flores** de antese noturna, dísticas, pediceladas, secundas; *brácteas florais* coriáceas, lisas, enrugadas ou fortemente nervado-sulcadas, geralmente não-carenadas ou levemente carenadas; *sépalas* simétricas, coriáceas, não carenadas, livres; *pétalas* obovais, simétricas, ápice arredondado ou obtuso e emarginado, formando corola campanulada, esverdeadas, verde-amareladas, branco-esverdeadas ou alvas, livres, com dois apêndices basais; *estames* inclusos, dispostos em dois grupos de três de cada lado; *filetes* livres e complanados; *anteras* dorsifixas próximo à base; *estilete* incluso ou exserto à corola; *estigma* tubolaciniado; *ovário* súpero. **Fruto** cápsula septícida; *sementes* numerosas com apêndice curto na extremidade apical.

Distribuição geográfica: Ocorre exclusivamente no Brasil, em *inselbergs* da Floresta Atlântica nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia, Alagoas e Pernambuco. A maioria das espécies ocorre no estado do Espírito Santo, onde é o centro de diversidade do gênero (Couto, 2017). Podem ser encontradas em *inselbergs* próximos

ao mar, ou em áreas interioranas, as quais estão localizadas entre 150 e 600 m de altitude, e em *inselbergs* de altitude, alcançando até 1.000 metros sobre o mar.

Etimologia: o nome foi dado em menção à forma do estigma do tipo tubo-laciniado, único entre as espécies de Bromeliaceae.

2.5.2 Descrição do complexo *Stigmatodon goniorachis*

O complexo *S. goniorachis* é composto por plantas epilíticas 10-121,3 cm de altura quando floridas, propagando-se por brotações nas axilas das folhas. FOLHAS suberetas a reflexas, coriáceas ou subcoriáceas, roseta infundibiliforme formando tanque; bainha elíptica ou elíptico-oblonga, 7,4-15,4 cm de comprimento e 4,8-10,3 cm de largura, castanha ou castanho-escura; lâmina estreito-triangular, convoluta, revoluta ou raramente retorcida, ápice acuminado-caudado, longo-caudado ou agudo, recurvado ou fortemente recurvado, margem truncada, 10,7-41,3 cm de comprimento e 1,1-3,8 cm de largura, verde-cinérea, verde-vinácea, verde-lúcida ou verde-escura, tricomas branco-cinéreos ou incolores. INFLORESCÊNCIA simples ou composta, reta ou sigmoide, ereta, subereta, patente a pendente, 12,1-40,3 cm de comprimento; brácteas do pedúnculo obovais, ovais ou elípticas 1,7-3,9 de comprimento e 1,1-2,5 de largura, eretas ou suberetas, mais curtas ou mais longas que os entrenós, verdes, verde-vináceas ou vináceas; brácteas florais largo-ovais, suborbiculares, orbiculares ou elíptico-ovais 1,2-3,9 cm de comprimento e 1,8-4,5 cm de largura, mais curtas que as sépalas, secundas com as flores, atropurpúreas, vináceas ou verde-vináceas. FLORES dísticas, suberetas, secundas na antese, pedicelo 0,4-1,8 cm de comprimento, recoberto com mucilagem incolor; sépalas elípticas, oblongo-ovais, elípticas ou ovais, 1,9-3,3 cm de comprimento e 1,2-2,6 cm de largura, verdes, verde-amareladas, verde-vináceas; pétalas levemente, obovais a largo-elípticas, simétricas, ápice obtuso, emarginado, recurvado na antese, 3-5,1 cm de comprimento e 1,2-3,9 cm de largura, brancas ou branco-esverdeadas, formando corola campanulada; estames inclusos com filetes livres, 2,1-5,0 de comprimento, pistilo 1,4-4,7 cm de comprimento, estigma tubolaciniado. FRUTO cápsula septicida fusiforme, 2,5-4,1 cm de comprimento, castanho; sementes castanhas com coma alvo.

2.5.3 Chave para identificação das espécies do complexo *Stigmatodon goniorachis*

1. Lâmina retorcida e espiralada com máculas vináceas; inflorescência reta e ereta a subereta; brácteas florais largo-ovais a suborbiculares, pétalas com até 5,1 cm de comprimento ... *S. brassicoides*
- 1'. Lâmina não retorcida e não espiralada sem máculas vináceas; inflorescência sigmoide subereta a pendente; brácteas florais largo-ovais, orbiculares ou elíptico-ovais a suborbiculares, pétalas menores que 4,5 cm de comprimento ... 2
2. Lâmina revoluta, verde com tricomas adensados formando faixas transversais ... *S. carioca sp. nov.*
- 2'. Lâmina convoluta, verde-lúcida, verde-vináceo ou verde-cinéreo, com tricomas distribuídos uniformemente ... 3
3. Lâmina foliar verde lúcido com margem vinácea; tricomas incolores não obscurecendo a lâmina foliar... *S. costae*
- 3'. Lâmina foliar toda verde; tricomas branco-cinéreos obscurecendo a lâmina foliar, pétalas obovais ou obovais a largo-elípticas ... 4
4. Inflorescência simples ou raramente composta, patente a pendente, bráctea floral vinácea pétalas obovais a largo-elíptica, ápice emarginado ... *S. goniorachis*
- 4'. Inflorescência sempre composta, patente, bráctea floral verde, pétala oboval, ápice obtuso ... *S. francae*

2.5.3.1 *Stigmatodon brassicoides* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss, Phytotaxa 279(1): 57. 2016. *Tillandsia brassicoides* Baker, Journal of Botany, British and Foreign 26: 12. 1888; *Vriesea brassicoides* (Baker) Mez, Monogr. Phan. 9: 598. 1896, pro syn. (Barfuss et al. 2016). Tipo: Brasil. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Corcovado, Burchell 1393 (holótipo K!).

Stigmatodon brassicoides é endêmica restrita das faces verticais da Pedra da Gávea, Pedra Bonita e Corcovado onde forma populações reduzidas e esparsas, com indivíduos formando pequenos agrupamentos isolados. Podem ser observadas floridas entre os meses de Maio e Julho e com frutos entre os meses de Junho e Agosto. A espécie está categorizada de acordo com os critérios da IUCN (2012) como “ criticamente em Perigo” (CR B1ab(iii)), principalmente devido a sua distribuição restrita EOO (5.17 Km²) e área de ocupação AOO (12 Km²), além do declínio contínuo da qualidade de habitat, pelos efeitos da proximidade das áreas urbanas, e pela intensa visitação de turistas e prática de escalada) (Costa *et al.*, 2018; Couto *et al.*, in prep.).

Stigmatodon brassicoides apresenta proximidade morfológica com *S. goniorachis*. Pode ser distinguida, pelo menor porte quando florida (19-31 cm vs. > 42-79,1 cm alt.), pelas lâminas retorcidas (vs. convolutas e não retorcidas), com o ápice fortemente recurvado para trás (vs. levemente recurvado), menor comprimento total (10,7-16 cm vs. até 27,8 cm), de coloração verde-vinácea ou verde-cinérea com máculas vináceas (vs. verde-vinácea) e pelo comprimento da inflorescência (12,1-16,2 cm vs. até 32,5 cm).

Os indivíduos de *S. brassicoides* coletados na Pedra da Gávea (PG) apresentam características morfológicas muito homogêneas, com exceção das lâminas foliares que variam entre verde-escuro e verde-vináceo em alguns indivíduos.

Material examinado: RIO DE JANEIRO: Rio de Janeiro, Pedra da Gávea, fl., 8.IV.1952, L.B. Smith 6430 et al. (NY); ibidem, fr. pass., 23.V.2007, C. França 8 (R); ibidem, fr., 26.V.2007, C. França 12 (R); ibidem, s.f., 10.V.1967, D. Sucre 1627 (RB); ibidem, fl.,

2004, R. Faria 20 (RB); ibidem, fl., fr., 6.III.2016, C. Baez 536, L. Paula, L. Azevedo & F. Silva (RB); ibidem, Pedra Bonita, fl. cult., 10.X.1997, R. Oliveira s.n. (HB 84649).

2.6.3.2 *Stigmatodon costae* (B.R. Silva & Leme) Leme, G.K. Br. & Barfuss, *Phytotaxa* 279(1): 57. 2016. *Vriesea costae* B.R. Silva & Leme, *J. Bromeliad Soc.* 51(4): 147. 2001. Tipo: Brasil. Rio de Janeiro: Niterói, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Praia de Itacoatira, Pedra do Costão, Camaleão, about 200 m above sea level, Jun. 2000, B.R. Silva 115, E. Leme 4926 & A.S. Garcia, fl. cult. Dec. 2000 to Feb. 2001 (holótipo HB!).

Stigmatodon costae apresenta distribuição conhecida restrita a um único *inselberg* litorâneo do município de Niterói, na localidade de Itacoatira, dentro dos limites do Parque Estadual da Serra da Tiririca, onde forma população com muitos indivíduos agregados, apenas na face norte do *inselberg*. Podem ser observadas floridas entre os meses de Novembro e Janeiro e com frutos entre os meses de Dezembro e Fevereiro. Está categorizada de acordo com os critérios da IUCN (2012) como “Criticamente em Perigo” (CR B12ab(iii)+2ab(iii)), devido a sua pequena área de distribuição EOO (< 100 Km²) e área de ocorrência AOO (4 Km²), e pela redução da qualidade do habitat devido a proximidade com as áreas urbanas (Costa *et al.*, 2018; Couto *et al.*, *in prep.*).

Stigmatodon costae apresenta proximidade morfológica com *S. carioca sp. nov.* Pode ser distinguida pela coloração das folhas (verde-claro vs. verde-escuro), consistência (subcoriácea vs. fortemente coriácea), tipo e distribuição dos tricomas na lâmina foliar (tricomas incolores em toda a lâmina vs. tricomas alvos adensados em faixas transversais), e cor da margem foliar (com linha longitudinal vinácea vs. sem linha longitudinal vinácea), além da posição da inflorescência (subereta a patente vs. subereta a pendente).

Os indivíduos de *S. costae* não apresentaram grandes divergências morfológicas entre si. As pequenas variações encontradas são em relação ao comprimento e largura das folhas e no comprimento das inflorescências. *Stigmatodon costae* possui lâminas foliares

convolutas, sempre verdes com margem vinácea, poucos tricomas, inflorescência simples, brácteas florais verdes com ápice vináceo e flores brancas.

Material examinado: RIO DE JANEIRO: Niterói, Parque Estadual da Serra da Tiririca, *inselberg* Costão de Itacoatiara em face vertical, fr. pass., 12-V-2016, D.R. Couto 3296 & B.Paixão-Souza (R); Costão de Itacoatiara – Morro do Tucum, 24-XI-2017, fl. V.C. Manhães 734 & D.R. Couto (R); ibidem, 24-XI-2017, fl. V.C. Manhães 735 & D.R. Couto (R).

2.6.3.3 *Stigmatodon francae* D.R. Couto, Manhães & A.F. Costa, Novon 28: 275–280.2020. Tipo: Brazil. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Jacarepaguá, Parque Estadual da Pedra Branca, Pedra do Hime, em superfície vertical, 22°55'52"S, 043°24'47"W, 275 m, 10 Sep. 2018, V.C.Manhães & F.P.Uribbe 897 (holotype, R [barcode] 239586!).

Stigmatodon francae é endêmica da Pedra do Hime, localizada na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro, na região de Jacarepaguá, dentro dos limites do Parque Estadual da Pedra Branca. Neste local, esta espécie forma grande população com muitos indivíduos agregados, vegetando em penhascos verticais, principalmente voltados para face norte do *inselberg*. Podem ser observadas floridas entre os meses de Agosto a Outubro. Esta espécie está categorizada de acordo com os critérios da IUCN (2012) como “Vulnerável” (VU D2) devido sua área de ocupação AOO (54 Km²), pela proximidade com área de mineração, e pela proximidade com as áreas urbanas, o que pode levar ao declínio na qualidade do habitat (Couto *et al.*, *in prep.*).

Stigmatodon francae apresenta proximidade morfológica com *S. goniorachis*. Pode ser distinguida pelo maior porte quando florida (91,1-121,3 cm vs. 42,7-79,1 cm de comprimento), pelo maior comprimento das lâminas (33,0-41,3 cm vs. 20,1-27,8 cm de comprimento), pelo ápice da lâmina (ápice longo-acuminado vs. ápice agudo), pelo tipo de inflorescência (sempre composta vs. simples ou raramente composta), e pelo maior comprimento da inflorescência (29,0-40,3 cm vs. 20,6-32,5 cm de comprimento).

Os indivíduos representantes de *S. francae* coletados na Pedra do Hime (PH) não apresentaram grandes discrepâncias em suas características morfológicas. Tanto o tamanho das lâminas, dos ramos floríferos, quanto a presença de tricomas foliares não apresentaram divergências evidentes. Nesta localidade os indivíduos de *S. francae* evidenciaram folhas verde-cinéreas com muitos tricomas, lâmina foliar convoluta, inflorescência ramificada, brácteas florais verdes e flores branco-esverdeadas.

Material examinado: BRAZIL. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Jacarépaguá, Parque Estadual da Pedra Branca, Pedra do Hime, 22°55'52.0S, 043°24'47.0W, 5 Mar. 2016 (fl.), C.R.P.França s.n. (Parátipo R 239873); Jacarepaguá, 13 May 1974 (fl.), Reitz 7597 (Parátipo HBR).

2.6.3.4 *Stigmatodon goniorachis* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss, *Phytotaxa* 279(1): 57. 2016. *Tillandsia goniorachis* Baker, *J. Bot.* 25: 303. 1887. *Vriesea goniorachis* (Baker) Mez, in Martius, *Fl. Bras.* 3(3): 545-546. 1894, pro syn. (Barfuss et al. 2016). Tipo: Brasil. Rio de Janeiro: Pedra do Ilheu, à Andaraí Grande, Set 1884, Glaziou 15471 (lectótipo K!; isolectótipo C, G!, GH!, LE!, P!, BR!, GE!), Glaziou 16462 (sintipo K!, P!).

Stigmatodon goniorachis é endêmica dos *inselbergs* litorâneos da região metropolitana do Rio de Janeiro. Nesses locais formam grandes populações tanto com indivíduos muito agregados, quanto distribuídos de forma mais esparsa no *inselberg*, principalmente nas faces voltadas para o norte. Podem ser observadas floridas entre os meses de Setembro e Fevereiro e com frutos entre os meses de Janeiro e Abril. Foi classificada de acordo com os critérios da IUCN (2012) como “Em perigo” (EM B1b(iii)+2b(iii)) devido sua distribuição restrita EOO (123,37 Km²) e AOO (28 Km²) e declínio da qualidade de habitat e pela abertura de vias de escalada sem os devidos cuidados.

Stigmatodon goniorachis apresenta proximidade morfológica com *S. francae*. Pode ser distinguida pelo menor porte quando florida (42,7-79,1 cm vs. 91,1-121,3 cm de

comprimento), pelo menor comprimento das lâminas (20,1-27,8 cm vs.33-41,3 cm de comprimento), pelo ápice da lâmina (ápice agudo vs. ápice longo-acuminado), pelo tipo de inflorescência (simples ou raramente composta vs. sempre composta), e pelo menor comprimento da inflorescência (20,6-32,5 cm vs. 29-40,3 cm de comprimento).

As populações de *S. goniorachis* de Morro da Babilônia (MB) e Pico da Tijuca (PT) apresentaram folhas com características semelhantes com coloração verde-vináceo com muitos tricomas, e lâmina foliar convoluta, inflorescência simples ou raramente composta, brácteas florais vináceas e flores branco-esverdeadas.

Material examinado: RIO DE JANEIRO: Rio de Janeiro, Recreio dos Bandeirantes, Pedra de Itanhangá, 31-I-1965, fl., N.Santos 5420 (R); Ibidem, Pedra do Itanhangá, 13-V-1965, fl., N.Santos 5858 (R); Ibidem, Pedra do Itanhangá, Estrada Barra da Tijuca, 31-I-1965, fl., N.Santos 5421 (R); Ibidem, Pedra do Itanhangá, estrada Jacarepaguá - Barra da Tijuca (entre o clube dos Médicos e a Pousada do Sol, mais ou menos de frente ao número 4.001), 12-I-1965, fr., N.Santos 5327 (R); Ibidem, Pedra de Itanhangá, estrada Barra da Tijuca (de frente do Rancho pousada do Sol), na pedra, 13.V.1965, fl., N.Santos 5857 (R); Ibidem, Pedra do Itanhangá, I.1990, s.fl., S.T. Meirelles 23.230 (UEC); Floresta da Tijuca, via de escalada Paredão Paraíso Perdido (P3), 25-V-2007, fr., C.R.P.França 11 (R); Ibidem, Morro do Andaraí Maior, na via de escalada Lionel Brizola, 15-VI-2007, fl. passada, C.R.P.França 16 (R); Parque Estadual Municipal da Prainha, formando grande população em local ensolarado, 29-VI-2009, fr., R.C.Forzza 2409, C.Nicoletti, L.A.Zaldini & R.Dias-Melo (RB); Ibidem, Parque Municipal Ecológico da Prainha, trilha para Morro Boa Vista, 19-IX-2003, fr., M.Bocayuva 66 (RB); Ibidem, 169 Barra da Tijuca, saxícola heliófila, inflorescência secunda, 15-VIII-1967, fl., P.S.Braga 859 & R.Braga 15 (RB); Morro da Babilônia, 15-XII-2017, fr. V.C.Manhães 800 (R); ibidem, 15-XII-2017, fr. V.C.Manhães 801 (R); ibidem, 15-XII-2017, fr. V.C. Manhães 802 (R); ibidem, 24-III-2018, fr. V.C.Manhães 806 (R); ibidem, 28-III-2018, fr. V.C. Manhães 815 (R); ibidem, 28-III-2018, fl. V.C.Manhães 826 (R); ibidem, 28-III-2018, fr. V.C.Manhães 827 (R).

2.6.3.5 *Stigmatodon carioca sp. nov.*

PLANTA epilítica 40,4-58,7 cm de altura quando fértil, propagando-se por brotações basais. FOLHAS rosuladas, suberetas, coriáceas, roseta infundibuliforme formando tanque; bainha oblongo-elíptica 8,8-14,5 cm de comprimento e 6,4-8,6 cm largura, castanho-escuro, densamente lepidoto em ambas as faces; lâmina triangular a estreito-triangular, ápice agudo, recurvado, revoluta, 16,8-25,6 cm de comprimento e 1,7-3,7 cm de largura, verde-escuro, com tricomas alvos adensados formando faixas transversais. INFLORESCÊNCIA simples, reta ou sigmoide, subereta a pendente, de 12,4-24,1 cm de comprimento; pedúnculo com 18,6-43,5 cm de comprimento e 0,33-0,53 cm de diâmetro, verde, glabro; brácteas do pedúnculo elípticas, 2,0-3,3 cm de comprimento e 1,2-1,9 cm de largura, eretas, pouco mais curtas que os entrenós; brácteas florais elíptico-ovais a suborbiculares com ápice obtuso, 2,1-2,8 cm de comprimento e 1,8-2,9 cm de largura, mais curtas que as sépalas, verdes com ápice vináceo, com indumento lepidoto esparso. FLORES com mucilagem incolor, secundas na antese; pedicelo 0,4-0,7 cm de comprimento; sépalas elípticas a ovais, 2,0-2,8 cm de comprimento e 1,3-1,8 cm de largura, verdes, carnosas na base, margem membranosa, sem indumento; pétalas obovais a largo-elípticas, simétricas, ápice emarginado, obtuso, 3,0-3,8 cm de comprimento e 1,4-2,1 cm de largura, brancas, formando corola campanulada; apêndices petalares abovais, ápice irregularmente bidentado, 1,3 cm de comprimento e adnatos à pétala por 0,8 cm; estames inclusos com filetes livres, de 2,5-2,9 cm de comprimento, pistilo de 1,4-2,1 cm de comprimento, estigma tubolaciniado. FRUTO cápsula septicida, fusiforme, de 3,7 cm de comprimento, castanho.

Material examinado: RIO DE JANEIRO: Rio de Janeiro, Pão de Açúcar, escarpa, 20-VII-1957, fr., Carauta 37 (R); Morro do Pavão, Posto 6, saxícola heliófila crescendo em paredão rochoso, 21-VIII-1967, s.fl., D.Sucre 1574 (RB); Parque Estadual da Chacrinha, 26-VI-2007, fr., L.I.T.Cardoso 155 (RB); Ibidem, vegetando em face vertical de *inselberg*, face sul, 25-II-2015, fl., fr., D.R.Couto 3074 & L.I.T.Cardoso (R); Ibidem, vegetando em face vertical de *inselberg*, face sul, 25-II-2015, fl., fr., D.R.Couto 3384 & L.I.T.Cardoso (R); Pão de Açúcar, vegetando em face vertical de *inselberg*, face sul, 25-

II-2015, fl., fr., D.R. Couto 3074 & L.I.T. Cardoso (R); ibidem, vegetando em face vertical de *inselberg*, face sul, 25-II-2015, fl., fr., D.R. Couto 3384 & L.I.T. Cardoso (R); ibidem, Morro da Urca, 25-X-2013, fl., fr., D.R. Couto 2378 & R. Moura (R); Pão de Açúcar, 24-XI-2017, fl. V.C. Manhães 733 (R); Morro São João, 21-III-2018, fl. V.C. Manhães 805 (R); Pão de Açúcar, 26-III-2018, fr. V.C. Manhães 807 (R); ibidem, 27-III-2018, fr. V.C. Manhães 808 (R); ibidem, 27-III-2018, fr. V.C. Manhães 809 (R); ibidem, 27-III-2018, fr. V.C. Manhães 813 (R); ibidem, 27-III-2018, fr. V.C. Manhães 814 (R).

Fenologia: Plantas encontradas floridas em campo entre os meses de Outubro e Março e com frutos entre os meses de Janeiro e Abril.

Distribuição geográfica: *Stigmatodon carioca sp. nov.* é endêmica de *inselbergs* litorâneos da região metropolitana do Rio de Janeiro, onde observa-se grandes populações nas faces verticais dos *inselbergs*, principalmente na face sul do Pão de Açúcar e do Morro São João.

Status de conservação: Apesar de possuir populações protegidas em Unidades de Conservação (Monumento Natural do Morro da Urca e Pão de Açúcar e Parque Estadual da Chacrinha), *S. carioca sp. nov.* possui distribuição restrita com EOO (< 100 Km²) e AOO (2.7 Km²) e apresenta um declínio contínuo da qualidade de hábitat, pelos proximidade a área urbana, visitação intensa de turistas e pela prática de montanhismo, com a retirada de indivíduos maduros para abertura de vias de escalada nesses locais. Nesse sentido, a espécie foi categorizada de acordo com os critérios da IUCN (2012) como “ criticamente em Perigo ” (CR B12ab(iii)).

Etimologia: O epíteto específico “ carioca ” homenageia a cidade do Rio de Janeiro, região onde ocorre com exclusividade a espécie *S. carioca sp. nov.* em um dos cartões postais mais conhecidos do mundo, o Pão-de-Açúcar.

Comentários: *Stigmatodon carioca sp. nov.* apresenta proximidade morfológica com *S. costae*. Pode ser distinguida pela coloração das folhas (verde-escuro vs. verde-claro), consistência (fortemente coriácea vs. subcoriácea), presença de tricomas (tricomas em faixas transversais vs. tricomas incolores), e margem foliar (sem linha longitudinal

vinácea vs. com linha longitudinal vinácea), além da posição da inflorescência (subereta a pendente vs. subereta a patente).

As populações de Pão-de-Açúcar (PA) e Morro São João (MSJ) apresentaram características morfológicas similares com folhas totalmente verdes, com poucos tricomas distribuídos em forma de faixa transversal e lâmina foliar revoluta, inflorescência simples, brácteas florais verdes com ápice vináceo e flores brancas. Essas duas populações estão estabelecidas na face sul dos *inselbergs* (Fig. 13).



Figura 13. *Stigmatodon carioca* sp. nov. A – indivíduo, B – detalhe da roseta, C – detalhe da lâmina foliar, D – detalhe das brácteas florais, E – detalhe da flor. (Photos: V.C. Manhães).

Referências bibliográficas padronizadas de acordo com o periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Referências

- Agostini K, Sazima M, Galetto L. 2011.** Nectar production dynamics and sugar composition in two *Mucuna* species (Leguminosae, Faboideae) with different specialized pollinators. *Die Natur wissen schaften* **98**: 933–942.
- Agostini K, Lopes AV, Machado IC. 2014.** Recursos florais. In: Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC, eds. *Biologia da polinização*, 1st edn. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 129–150.
- Aguilar-Rodríguez PA, Krömer T, García-Franco JG, MacSwiney GMC. 2016.** From dusk till dawn: nocturnal and diurnal pollination in the epiphyte *Tillandsia heterophylla* (Bromeliaceae). *Plant Biology* **18**: 37–45.
- Aguilar-Rodríguez P, Krömer T, Tschapka M, García-Franco JG, Escobedo-Sarti J, MacSwiney MC. 2019.** Bat pollination in Bromeliaceae. *Plant Ecology & Diversity* **12**: 1–19.
- Alfaya MCF. 2010.** Morfologia e germinação de sementes de *Alcantarea nahoumii* J.R. Grant. (Leme). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- Araújo AC, Fischer EA, Sazima M. 2004.** As bromélias na região do Rio Verde. In: Marques O, Duleba W, eds. Estação ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna. Ribeirão Preto: *Holos Editora*: 162–172.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi, GM, Bered, F, Fay MF, Lexer C. 2007a.** Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**: 3759–3767.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C. 2007b.** Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to Neotropical high-altitude inselbergs, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* **16**: 1981–1992.
- Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S, Lexer, C. 2009.** Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related

bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* **103**: 65–77.

Barfuss MHJ, Till W, Leme EMC, Pizón JP, Manzanares JM, Halbritter H, Samuel R, Brown GK. 2016. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* **279**: 001–097.

Barrett SCH. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B* **358**: 991–1004.

Barton NH, Hewitt GM. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113–148.

Begon M, Harper JL, Townsend CR. 2006. *Ecology: From individuals to ecosystems*. 4^o ed. Oxford: Blackwell Publishing.

Boneh L, Kuperus P, Van Tienderen PH. 2003. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. *Molecular Ecology Notes* **3**: 302–303.

Borges RM, Somanathan H, Kelber A. 2016. Patterns and processes in nocturnal and crepuscular pollination services. *The Quarterly Review of Biology* **91**: 389–418.

Cardim DC, Carlini-Garcia LA, Mondin M, Martins M, Veasey EA, Ando A. 2001. Intraspecific variability in five populations of *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae - Oncidiinae) in Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botanica* **24(4)**: 553–560.

Cascante-Marín A, Trejos C, Madrigal R, Fuchs EJ. 2020. 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* **192**: 773–786.

Castello LV, Galetto L. 2013. How many taxa can be recognized within the complex *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae, Tillandsioideae)? Analysis of the available classifications using a multivariate approach. *Phyto Keys* **23**: 25–39.

Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI, Oliveira GCX. 2006. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from

Cadeia do Epinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation* **15(14)**: 4357–4373.

Cavalcante BP, Souza EH, Williams JH, Versieux LM. 2020. Reproductive systems and post-pollination barriers between two closely related eu-bromelioids (Bromeliaceae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 828–839.

Charlesworth D. 2006. Evolution of plant breeding systems. *Current Biology* **16**: R726–R735.

Christianini AV, Forzza RC, Buzato S. 2013. Divergence on floral traits and vertebrate pollinators of two endemic *Encholirium* bromeliads. *Plant Biology* **15**: 360–368.

Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144(4)**: 2001–2014.

Costa AF, Rodrigues PJFP, Wanderley MGL. 2009. Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 163–81.

Costa AF, Santos-Silva F, Martinelli G, Versieux LM, Louzada R, Amaro R, Filho SF, Messina T, Wimmer F, Maurenza D, Amorim T, Novaes L, Menezes V. 2018. Bromeliaceae. In: Martinelli G, Martins E, Moraes M, Loyola R, Amaro R. (Orgs.). Livro Vermelho da Flora Endêmica do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Rio de Janeiro. 456 p.

Couto DR. 2017. Revisão taxonômica e filogenia de *Stigmatodon* Leme, G.K BR. & Barfuss (Bromeliaceae – Tillandsioideae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional.

Couto DR, Manhães VC, Costa AF. 2020. *Stigmatodon francae* (Bromeliaceae, Tillandsioideae), a new species from cliff ecosystems on inselbergs in southeastern Brazil. *Novon* **28**: 1–6.

Couto DR, Kessous IM, Neves B, Paixão-Souza B, Faria CG, Barfuss MHJ, Salgueiro F, Sá-Haidad, Costa AF. In prep. Molecular phylogenetics and character evolution in *Stigmatodon* (Bromeliaceae, Tillandsioideae), an endemic genus to Brazilian rocky outcrops. *Botanical Journal of the Linnean Society*

- Coyne JA, Orr HA. 2004.** Speciation. *Sinauer Associates*, Sunderland: MA.
- Cummings G, Anderson S, Dennis T, Toth C, Parsons S. 2014.** Competition for pollination by the lesser short-tailed bat and its influence on the flowering phenology of some New Zealand endemics. *Journal of Zoology* **293**: 281–288.
- De Paula LFA, Azevedo LO, Mauad LP, Cardoso LJT, Braga MA, Kollmann JC, Fraga CN, Neto LM, Labiak PH, Mello-Silva R, Porembski S, Forzza RC. 2020.** Sugarloaf Land in south-eastern Brazil: a tropical hotspot of lowland inselberg plant diversity. *Biodiversity Data Journal* **8**: e53135.
- Dinakar C, Djilianov D, Bartels D. 2012.** Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science* **182**: 29–41.
- Doloso DM, Holsback-Menegucci Z.R, Santiago EF. 2009.** Efeitos da radiação ultravioleta-C sobre a simetria e morfoanatomia foliar de *Rapanea ferruginea* (Ruiz et. Pav) Mez. (Myrsinaceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences* **31**: 165–172.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15.
- Duarte EF, Carneiro IF, Silva NF, Guimarães NNR. 2010.** Características físicas e germinação de sementes de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **40(4)**: 422–429.
- Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford DJ, Winduss JL, Wolfe AD. 1999.** Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* **8**: 443–451.
- Excoffier L. 2007.** Analysis of population subdivision. In *Handbook of Statistical Genetics* (D. J. Balding, M. Bishop & C. Cannings, eds.): 980–1020. Chichester, UK: Wiley.
- Fidalgo O, Bonini VLR. 1989.** Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Fleming TH, Sosa VJ. 1994.** Effects of nectarivorous and frugivorous mammals on reproductive success of plants. *Journal of Mammalogy* **75**: 845–851.

- Fleming TH, Tuttle MD, Horner MA. 1996.** Pollination biology and the relative importance of nocturnal and diurnal pollinators in three species of Sonoran Desert columnar cacti. *The Southwestern Naturalist* **41**: 257–269.
- Fleming TH, Muchhala N, Ornelas JF. 2005.** New World nectar-feeding vertebrates: community patterns and processes. In: Sánchez-Cordero V, Medellín RA, editors. *Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa*. México City: *Instituto de Biología e Instituto de Ecología-UNAM*: 161–184.
- Fleming TH, Geiselman C, Kress WJ. 2009.** The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany* **104**: 1017–1043.
- Forzza RC. 2005.** Revisão Taxonômica de *Encholirium* Mart. Ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* **23**: 1–49.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2008.** *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280p.
- Galetto L, Bernardello G. 2004.** Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany* **94**: 269–280.
- Galetto L, Bernadello G. 2005.** Nectar. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC, eds. *Practical pollination biology*. Cambridge: Enviroquest.
- Geoffrey M. 1992.** *Sexual reproduction in plants*. San Diego: *Academic Press*.
- Glémin S, Bazin E, Charlesworth D. 2006.** Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society of London B* **273**: 3011–3019.
- Godoy FMR, Paggi, GM, Palma-Silva C. 2019.** Cross-amplification of nuclear microsatellite markers in *Aechmea distichanta* Lem. (Bromeliaceae). *Brazilian Journal of Botany* **42**: 353–359.
- Goetze M, Büttow MV, Zanella CM, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro FG, Sampaio JAT, Palma-Silva C, Cidade FW, Bered F. 2015.** Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* **58**: 204–210.

- Goetze M, Schulte K, Palma-Silva C, Zanella CM, Büttow MV, Capra F, Bered F. 2016.** Diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae) in the Brazilian Atlantic rainforest: A case study in *Aechmea* subgenus *Ortigiesia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **98**: 346–357.
- Goldman, DH, Berg CVD, Grith MP. 2004.** Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R.Br. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **247**: 37–60.
- Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Krapp F, Alves M, Wanderley MGL, Weising K. 2017.** Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *American Journal of Botany* **104(6)**: 1–11.
- Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Weising K, Wanderley MGL, Benko-Iseppon AM. 2020.** Genetic structure and gene flow among populations of *Encholirium magalhaesii*, a rocky grassland fields bromeliad. *Brazilian Journal of Botany* **43(2)**: 283–290.
- Goudet J. 1995.** FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity* **86**: 485–486.
- Grant V. 1981.** Plant speciation. *Columbia University Press*, New York.
- Guarçoni EAE, Azevedo AA, Costa AF. 2017.** The reestablishment of *Dyckia oligantha* and *D. nana* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae), belonging to the *D. macedoi* complex. *Phytotaxa* **306(1)**: 49–65.
- Guerra AT. 2001.** Novo dicionário Geológico – Geomorfológico. 2 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001.** PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Paleontologia Eletronica* **4(1)**: 1–9.
- Hamrick JL, Godt JW. 1996.** Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society London. B* **351**: 1291–1298.
- Han YC, Teng CZ, Zhong S, Zhou MQ. 2007.** Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nicifera* (Nelumbonaceae) in central China detected by ISSR markers. *Aquatic Botany* **86**: 69–75.

- Hansson B, Westerberg L. 2002.** On the correlation between heterozygosity. *Molecular Ecology* **11**: 2467–2474.
- Heinrich B. 1975.** Energetics of pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* **6**: 139–170.
- Heithaus ER, Fleming TH, Opler PA. 1975.** Patterns of foraging and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical community. *Ecology* **56**: 841–854.
- Henderson A. 2005.** A multivariate study of *Calypstrogyne* (Palmae). *Systematic Botany* **30**: 60–83.
- Hernández JCC, Wolf JHD, García-Franco JG, González-Espinosa. 1999.** The influence of humidity, nutrients and light on the establishment of the epiphytic bromeliad *Tillandsia guatemalensis* in the highlands of Chiapas, Mexico. *Revista de Biología Tropical* **47**: 763–773.
- Hess WJ, Stoyhoff NA. 1998.** Taxonomic status of *Quercus acerifolia* (Fagaceae) and a morphological comparison of our members of the *Quercus schumardii* complex. *Systematic Botany* **23**: 89–100.
- Hirsch LD, Zanella CM, Aguiar-Melo C, Costa LMS, Bered F. 2019.** Interspecific gene flow and an intermediate molecular profile of *Dyckia julianae* (Bromeliaceae), an endemic species from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 675–690.
- Hmeljevski KV, Freitas L, Domingues R, Pereira AR, Cancio AS, Andrade ACS, Machado MA, Viccini LF, Forzza RC. 2014.** Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. *Flora* **209**: 250–259.
- Hmeljevski KV, Reis MS, Forzza RC. 2015.** Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. *Journal of Heredity* **106(1)**: 93–101.
- Hmeljevski KV, Wolowski M, Forzza RC, Freitas L. 2017.** High outcrossing rates and short-distance pollination in a species restricted to granitic inselbergs. *Australian Journal of Botany* **65(4)**: 315–326.

- Hoban S, Bruford M, Jackson FD, Lopes-Fernandes M, Heuertz M, Hohenlohe PA, Paz-Vinas I, Sjögren-Gulve P, Segelbacher G, Vernesi C, Aitken S, Bertola LD, Bloomer P, Raça M, RodríguezCorrea H, Funk WC, Grueber CE, Hunter ME, Jafe R, Liggins L, Mergeay J, Moharrek F, O'Brien D, Ogden R, Palma-Silva C, Pierson J, Ramakrishnan U, Simo-Droissart M, Tani N, Waits L, Laikre L. 2020.** Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. *Biol Conserv* **248**: 108654.
- Howell DJ. 1977.** Time sharing and body partitioning in bat–plant pollination systems. *Nature* **270**: 509–510.
- INEA. 2015.** INEA – Instituto Estadual do Ambiente (RJ), Trilhas: Parque Estadual da Serra da Tiririca. Rio de Janeiro, 384p.
- IUCN. 2012.** IUCN Red list categories and criteria, version 3.1. Second edition. Prepared by the IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland; Cambridge, United Kingdom.
- Jacques SSA. 2015.** Revisão taxonômica do complexo *Billbergia amoena* (Lodd.) Lindl. (Bromeliaceae, Bromelioideae). Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Jain SK. 1976.** The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **7**: 469–495.
- Jones DR. 1994.** ‘The improvement and testing of *Musa*: a global partnership’. (INIBAP: Montpellier).
- Kay KM. 2006.** Reproductive isolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers. *Evolution* **60**: 538– 552.
- Kelly J, Jose S, Nichols JD, Bristow M. 2009.** Growth and physiological response of six Australian rainforest tree species to a light gradient. *Forest Ecology and Management* **257**: 287–293.
- Kessous IM, Neves B, Couto DR, Paixão-Souza B, Pederneiras LC, Moura RL, Barfuss MH, Salgueiro F, Costa AF. 2020.** Historical biogeography of a Brazilian lineage of Tillandsioideae (subtribe Vrieseinae, Bromeliaceae): the Paranaean Sea hypothesized as the main vicariant event. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 625–641.

- Kinsuat MJ, Kumar SV. 2007.** Polymorphic microsatellite and cryptic implerepeat sequence markers in pineapples (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Molecular Ecology Notes* **7**: 1032–1035.
- Krömer T, Gradstein SR. 2003.** Species richness of vascular epiphytes in two primary forests and fallows in the Bolivian Andes. *Selbyana* **24**: 190–195.
- Lavor P, Van Den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM. 2014.** Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the iron quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* **101(7)**: 1–9.
- Legendre P, Legendre L. 1998.** Numerical ecology. 2nd English edition. *Elsevier*, Amsterdam.
- Leme EMC, Brown GK. 2004.** Four new lithophytic *Vriesea* species (Tillandsioideae) from Southeastern Brazil. *Vidalia* **2(1)**: 3–11.
- Leme EMC, Fraga CN, Kollmann LJC, Brown GK, Till W, Ribeiro OBC, Machado MC, Monteiro FJS, Fontana AP. 2010.** Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. *Rodriguésia* **61(1)**: 021–067.
- Leme EMC. 2012.** Revision of the Lithophytic *Vriesea* Species from Minas Gerais, Brazil - Part V: Two tubolaciniate stigma-type new species. *Journal of the Bromeliad Society* **62(1)**: 10–19.
- Leme EMC, Till W, Kollmann LJC, Moura RL, Ribeiro OBC. 2014.** Miscellaneous new species of Brazilian Bromeliaceae – III. *Phytotaxa* **177(2)**: 061–100.
- Levin DA. 1971.** The origin of reproductive isolating mechanisms in flowering plants. *Taxon* **20**: 91–113.
- Levin DA. 1972.** Competition for pollinator service: a stimulus for the evolution of autogamy. *Evolution* **26**: 668–669.
- Lexer C, Marthaler F, Humbert S, Barbará T, Harpe ML, Bossolini E, Paris M, Martinelli G, Versieux L. 2016.** Gene flow and diversification in a species complex of *Alcantarea* inselberg bromeliads. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 505–520.

- Lima RF. 2012.** Comportamento germinativo de espécies rupícolas de *inselbergs* do Morro da Urca, Rio de Janeiro – RJ. Dissertação de mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.
- Lobo JA, Quesada M, Stoner KE, Fuchs EJ, Herrerías-Diego Y, Rojas J, Saborío G. 2003.** Factors affecting phenological patterns of bombacaceous trees in seasonal forests in Costa Rica and Mexico. *American Journal of Botany* **90**: 1054–1063.
- Loh R, Scarano FR, Alves-Ferreira M, Salgueiro F. 2015.** Clonality strongly affects the spatial genetic structure of the nurse species *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **178**: 329–341.
- Loh R, Scarano FR, Alves-Ferreira M, Salgueiro F. 2019.** Fine-scale spatial genetic structure, neighbourhood size and gene dispersal in clonal plants: exploring the best possible estimates. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 760–772.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH. 2008.** The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **363**: 3009–3021.
- Machado TM, Loideau O, Paris M, Weigand A, Versieux LM, Stehmann JR, Lexer C, Salamin N. 2019.** Systematics of *Vriesea* (Bromeliaceae): phylogenetic relationships based on nuclear gene and partial plastome sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* **20**: 1–19.
- Manhães VC, Miranda FD, Clarindo WR, Carrijo TT. 2019.** Genetic diversity and karyotype of *Pitcairnia azouryi*: an endangered species of Bromeliaceae endemic to Atlantic Forest inselbergs. *Molecular Biology Reports* **47**: 179–189.
- Manhães VC, Couto DR, Salgueiro S, Costa AF. 2020.** Transferability of nuclear microsatellite markers to *Stigmatodon* species: a bromeliad genus endemic to vertical cliffs of inselbergs in Brazil. *Brazilian Journal of Botany* **43**: 823–830.
- Margis R, Caldas JF, Salgueiro F, Félix DB, Araújo DSD, Breyne P, Montagu MV, Oliveira D, Margis-Pinheiro M. 2002.** Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. *Biodiversity and Conservation* **11**: 149–163.
- Marshall JL, Arnold ML, Howard DJ. 2002.** Reinforcement: the road not taken. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 558–563.

- Marques JS, Tagliati MC, Faria AP. 2015.** Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* Regel (Bromeliaceae) and the first record of chiropterophily for the genus. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **87**: 835–842.
- Martinelli G. 1994.** Reproductive biology of Bromeliaceae in Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Unpublished PhD Thesis*, University of St. Andrews.
- Martinelli G, Moraes MA. 2013.** Livro vermelho da flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.
- Matallana G, Godinho ASM, Guilherme FAG, Belisário M. 2010.** Breeding systems of Bromeliaceae species: Evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Systematics and Evolution* **289**: 57–65.
- Matallana G, Oliveira PE, Silva PRR, Wendt T. 2016.** Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 521–531.
- McCune B, Mefford MJ. 1999.** PC-ORD Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 4. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, USA.
- Melo A. 2012.** Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Millar MA, Coates DJ, Byrne M. 2013.** Genetic connectivity and diversity in inselberg populations of *Acacia woodmaniorum*, a rare endemic of the Yilgarn Craton banded iron formations. *Heredity* **111**: 437–444.
- Miranda FD, Gontijo ABPL, Santiliano FC, Favoreto FC, Soares TCB. 2012.** Transferability and Characterization of Microsatellite Markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae. *Biota Neotropica* **12(3)**: 319–323.
- Mota MR, Pinheiro F, Leal BSS, Wendt T, Palma-Silva C. 2019.** The role of hybridization and introgression in maintaining species integrity and cohesion in naturally isolated inselberg Bromeliads populations. *Plant Biology* **21**: 122–132.
- Motten AF. 1982.** Autogamy and competition for pollinators in *Hepatica americana* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* **69**: 1296–1305.

- Muchhala N, Potts MD. 2007.** Character displacement among bat-pollinated flowers of the genus *Burmeistera*: analysis of mechanism, process and pattern. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **274**: 2731–2737.
- Muchhala N. 2008.** Functional significance of interspecific variation in *Burmeistera* flower morphology: evidence from nectar bat captures in Ecuador. *Biotropica* **40**: 332–337.
- Muchhala N, Caiza A, Vizcete .C, Thomson JD. 2008.** A generalized pollination system in the tropics: bats, birds and *Aphelandra acanthus*. *Annals of Botany*. **103**: 1481–1487.
- Muchhala N, Thomson JD. 2010.** Fur versus feathers: pollen delivery by bats and hummingbirds and consequences for pollen production. *The American Naturalist* **175**: 717–726.
- Muchhala N, Thomson JD. 2012.** Interspecific competition in pollination systems: costs to male fitness via pollen misplacement. *Functional Ecology* **26**: 476–482.
- Naczi RFC, Reznicek AA, Ford BA. 1998.** Morphological, geographical and ecological differentiation in the *Carex willdenowii* complex (Cyperaceae). *American Journal of Botany* **85**: 434–447.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Nepi M. 2007.** Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson S, Nepi M, Pacini E, eds. *Nectaries and nectar*. Dordrecht: Springer Netherlands 129–166.
- Neri J, Palma-Silva C, Leles B, Santos MF, Wendt T. 2017.** Variation in reproductive systems facilitates species boundaries of sympatric *Vriesea* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **182**: 272–279.
- Neves B, Uribe FP, Jacques SSA, Zanella CM, Costa AF. 2018.** Species boundaries in the *Vriesea incurvate* (Bromeliaceae) complex after a broad morphometric and taxonomic study. *Systematic Botany* **43(4)**: 870–888.
- Neves B, Kessous IM, Moura RL, Couto DR, Zanella CM, Antonelli A, Bacon CD, Salgueiro F, Costa AF. 2020.** Pollinators drive floral evolution in an Atlantic Forest genus. *AoB Plants* **12(5)**: 1–12.

- Newmaster SG, Balasubramaniam V, Murugesan M, Ragupathy S. 2008.** *Tripogon cope* (Poaceae: Chloridoideae), a new species supported by morphometric analysis and a synopsis of *Tripogon* in India. *Systematic Botany* **33(4)**: 695–701.
- Nielsen LR, Cowan RS, Siegismund HR, Adersen H, Philipp M, Fay MF. 2003.** Morphometric, AFLP and plastid microsatellite variation in populations of *Scalesia divisa* and *S. incisa* (Asteraceae) from the Galapagos Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society* **143**: 243–254.
- Nybom H. 2004.** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143–1155.
- Orive ME. 1993.** Effective population size in organisms with complex life-histories. *Theoretical Population Biology* **44**: 316–340.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2006.** A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes* **7(4)**: 654–657.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2009.** Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* **103**: 503–512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay M F, Cozzolino S, Lexer C. 2011.** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* **20**: 3185–3201.
- Panarari RS. 2006.** Variabilidade genética evidenciada por marcadores nucleares e do genoma mitocondrial de espécies do gênero *Brycon* (Characiformes: Characidae) de três bacias hidrográficas. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Curso de Ecologia de Ambientes.
- Parachnowitsch AL, Manson JS, Sletvold N. 2019.** Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany* **20**: 1–15.
- Paula CC, Silva HMP. 2001.** Cultivo prático de bromélias. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

- Pereira AG, Bernardi UCS, Manhães VC, Ferreira RS, Miranda FD. 2017.** Cross-amplification and characterization of microsatellite markers in *Alcantarea patriciae* Versieux & Wand. *Genetics and Molecular Research* **16(2)**: gmr16029692.
- Petit RJ, Excoffier L. 2009.** Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution* **24(7)**: 386–393.
- Pillar VD. 1999.** How sharp are classifications? *Ecology* **80(8)**: 2508–2516.
- Pinangé DSB, Louzada RB, Wöhrmann T, Krapp F, Weising K, Zizka G, Polo EM, Wanderley MGL, Benko-Iseppon AM. 2019.** Population genetics shed light on species delimitation and life history of the *Dyckia pernambucana* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **20**: 1–20.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S. 2011.** Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography* **38(10)**: 1923–1935.
- Pinheiro F, Cozzolino S, Draper D, Barros F, Félix LP, Fay MF, Palma-Silva C. 2014.** Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. *Evolutionary Biology* **14**: 49–64.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999.** A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**: 502–503.
- Pontes JAL. 1987.** Serra da Tiririca, RJ: Necessidade de Conservação (Primeira Contribuição). *Boletim da Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza* **22**: 89–94.
- Porembski S, Martinelli G, Ohlemüller R, Barthlott W. 1998.** Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Diversity and Distributions* **4**: 107–119.
- Porembski S, Barthlott W. 2000.** Inselbergs: biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. *Ecological studies* 146. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag.

- Povh JA, Moreira HLM, Ribeiro RP, Prioli AJ, Vargas L, Blanck DV, Gasparino E, Streit PD. 2005.** Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica RAPD. *Acta Scientiarum* **27**: 1–10.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Pyke GH. 2016.** Floral nectar: pollinator attraction or manipulation? *Trends in Ecology & Evolution* **31**: 339–341.
- QGIS Development Team. 2019.** QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://www.qgis.org/>.
- Queiroz JA, Quirino ZGM, Lopes A., Machado IC. 2016.** Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: a bromeliad pollinated by bats, opossum, and hummingbirds in a tropical dry forest. *Journal of Arid Environments* **125**: 21–30.
- Radford AE, Dickson WC, Massey JR, Bell CR. 1974.** Vascular Plant Systematics. Haper & Row Publishers, New York.
- Ricklefs RE. 2003.** A economia da natureza. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007.** Plant speciation. *Science* **317**: 910–914.
- Ruas RB, Paggi GM, Aguiar-Melo C, Hirsh LD, Bered F. 2020.** Strong genetic structure in *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae), na endangered species found on ironstone outcrops in Pantanal, Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 691–705.
- Saitou N, Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–25.
- Sánchez-Lafuente AM, Guitián J, Medrano M, Herrera CM, Rey PJ, Cerdá X. 2005.** Plant traits, environmental factors, and pollinator visitation in winter-flowering *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae). *Annals of Botany* **96**: 845–852.
- Sánchez CFB. 2008.** Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa.

- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J, Samadi S. 2003.** Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes* **3**: 221–223.
- Savolainen V, Anstett MC, Lexer C, Baker WJ. 2006.** Sympatric speciation in palms on an Oceanic Island. *Nature* **441**: 210–3.
- Sazima M, Buzato S, Sazima I. 1999.** Bat-pollinated flower assemblage and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. *Annals of Botany* **83**: 705–712.
- Shepherd GJ. 2010.** FITOPAC. Versão 2.1. Campinas, SP: Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
- Silva MD. 2012.** Resiliência e susceptibilidade de tipos funcionais vegetais na paisagem no semiárido nordestino. Tese (Doutorado em Geografia). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.
- Silva Jorge J, Silva Rocha LH, Silva Jorge JP, Pierote Sousa PH, Xavier Freire EM. 2018.** Floral visitors and potential pollinators of a rupicolous bromeliad (Pitcairnioideae) in the Brazilian semiarid. *Neotropical Biology and Conservation* **13**: 101–110.
- Siqueira Filho JA. 2003.** Fenologia da floração, ecologia da polinização e conservação de Bromeliaceae na Floresta Atlântica Nordeste. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Brasil.
- Siqueira-Filho JA, Leme EMC. 2006.** Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste - biodiversidade, conservação e suas bromélias. Rio de Janeiro: *Andrea Jakobsson Estúdio*.
- Slatkin M. 1987.** Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* **236**: 787–792.
- Slatkin M. 1995.** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**: 457–462.
- Small E, Fawzy M. 1992.** Morphogeographic variation in the *Medicago monantha* complex. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1292–1301.
- Smith LB, Downs R. 1977.** Bromeliaceae, sub-family Tillandsioideae. Flora Neotropica, *Hafner Press*, New York, mon. **14(2)**: 663–1492.

- Soares LE, Goetze M, Zanella CM, Bered F. 2018.** Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. *Genetics and Molecular Biology* **41(1)**: 308–317.
- Souza EH, Versieux LM, Souza FVD, Rossi ML, Costa MAPDC, Martinelli AP. 2017.** Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. *Scientia Horticulturae* **223**: 53–61.
- Stewart A, Dudash MR. 2016.** Differential pollen placement on an Old-World nectar bat increases pollination efficiency. *Annals of Botany* **117**: 145–152.
- Stewart AB, Dudash MR. 2017.** Field evidence of strong differential pollen placement by old world bat-pollinated plants. *Annals of Botany* **119**: 73–79.
- Sultan SE. 2003.** Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evolution & Development* **5**: 25–33.
- Swofford DL, Olsen GJ. 1990.** Phylogeny reconstruction. In: *Molecular Systematics* (Hillis, D.M. and Moritz, C., eds.). Sunderland, Massachusetts: 411–501.
- Tapper SL, Byrne M, Yates CJ, Keppel G, Hopper SD, Van Niel K, Schut AGT, Mucina L, Wardell-Johnson GW. 2014.** Prolonged isolation and persistence of a common endemic on granite outcrops in both mesic and semi-arid environments in south-western Australia. *Journal of Biogeography* **41(11)**: 2032–2044.
- Todeschini C, Parizotto JL, Guzman F, Zanella CM, Margis R, Goetze M, Paggi GM, Costa LMS, Aguiar-Melo C, Hirsh LD, Bered F. 2018.** Development, characterization, and transferability of SSR markers for *Vriesea carinata* (Bromeliaceae) based on RNA sequencing. *Applications in Plant Sciences* **6(10)**: e1184.
- Trovó M, Sano PT, Winkworth R. 2008.** Morphology and environment: geographic distribution, ecological disjunction, and morphological variation in *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano (Eriocaulaceae). *Feddes Repertorium* **119(7-8)**: 634–643.
- Truchado P, Ferreres F, Bortolotti L, Sabatini AG, Tomás-Barberán FA. 2008.** Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of Acacia (*Robinia pseudacacia*) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 8815–8824.

- Tschapka M, Dressler S. 2002.** Chiropterophily: on bat-flowers and flower bats. *Curtis Botanical Magazine (Series 6)* **19**: 114–125.
- Tschapka M. 2004.** Energy density patterns of nectar resources permit coexistence within a guild of Neotropical flower-visiting bats. *Journal of Zoology* **263**: 7–21.
- Tschapka M, Dressler S, von Helversen O. 2006.** Bat visits to *Marcgravia pittieri* and notes on the inflorescence diversity within the genus *Marcgravia* (Marcgraviaceae). *Flora* **201**: 383–388.
- Tumi L, Zhang Y, Wang Z, Suni ML, Burgess KS, Ge X. 2019.** Microsatellite markers for the endangered *Puya raimondii* in Peru. *Applications in Plant Sciences*. **7(12)**: e11308.
- Uribbe FP, Neves B, Jacques SSA, Costa, AF. 2020.** Morphological variation in the *Vriesea procera* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) in the Brazilian Atlantic Rainforest, with recognition of new taxa. *Systematic Botany* **45(1)**: 53–68.
- Valladares F, Sánchez-Gómez D, Zavala MA. 2006.** Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* **94**: 1103–1116.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley PF. 2004.** MICRO-CHECKER: For identify ingand correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**: 535–538.
- Versieux LM, Wendt T. 2006.** Checklist of Bromeliaceae of Minas Gerais, Brazil, with notes on taxonomy and endemism. *Selbyana* **27**: 107–146.
- Versieux LM, Wanderley MGL. 2015.** *Bromélias-gigantes do Brasil*. Natal: Capim Macio & Offset Gráfica e Editora Ltda.
- Webb CT, Hoeting JÁ, Ames GM, Pyne MI, Poff NL. 2010.** A structured and dynamic framework to advance traits-based theory and prediction in ecology. *Ecology Letters* **13**: 267–283.
- Wendt T. 1999.** Hibridização e isolamento reprodutivo em *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Unpublished PhD Thesis*, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Wendt T, Canela MBF, Morrey-Jones J., Henriques AB, Rios RI. 2000.** Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. *Systematic Botany* **25**: 389–398.
- Wendt T, Canela MB, Faria APG, Rios RI. 2001.** Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **88**: 1760–1767.
- Wendt T, Canela MBF, Klein DE, Rios RI. 2002.** Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **232**: 201–212.
- Wendt T, Coser TS, Matallana G, Guilherme FAG. 2008.** An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **275**: 31–41.
- Weir B, Cockerham C. 1984.** Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.
- Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009.** Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* **102**: 31–38.
- Wöhrmann T, Michalak I, Zizka G, Weising K. 2019.** Strong genetic differentiation among populations of *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) in Bolivia. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192(4)**: 744–759.
- Wright S. 1921.** Systems of mating. *Genetics* **6**: 111–178.
- Wright S. 1965.** The interpretation of population structure by F -statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395–420.
- Xu H, Wu J, Liu Y, Ding H, Zhang M, Wu Y, Wang, L. 2008.** Biodiversity Congruence and Conservation Strategies: A National Test. *BioScience* **58(7)**: 632–639.
- Young A, Boyle T, Brown T. 1996.** The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 413–418.
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F. 2011.** Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **98**: 1511–1519.

Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F. 2012. Genetics, Evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*. **35(4)**: 1020–1026.

Zambon V, Agostini K, Nepi M, Rossi ML, Martinelli AP, Sazima M. 2019. Nectar as manipulator: how nectar traits influence changes in pollinator groups of *Aechmea vanhoutteana*, a bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192(4)**: 803–815.

Zimmermann M. 1983. Plant reproduction and optimal foraging: experimental nectar manipulations in *Delphinium nelsonii*. *Oikos* **41**: 57–63.

Capítulo 3

Is there a variation in the content of nuclear DNA and number of chromosomes of species occurring naturally fragmented? A case study of the genus *Stigmatodon* (Tillandsioideae, Bromeliaceae)

Is there a variation in the content of nuclear DNA and number of chromosomes of species occurring naturally fragmented? A case study of the genus *Stigmatodon* (Tillandsioideae, Bromeliaceae)

Abstract

This study evaluates the average content of nuclear DNA (2C) and the number of chromosomes of four species of the *Stigmatodon goniorachis* complex (*S. costae*, *S. francae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon sp. nov.*) endemic to Atlantic Forest inselbergs, by means of the study of their populations. In this sense, we analyzed whether the naturally fragmented form and the xeric environments of the inselbergs can influence and / or alter both the nuclear DNA content and the number of chromosomes of the four species of the *S. goniorachis* complex. For flow cytometry analyzes, leaf samples from 10 adult individuals from each of the six populations were used, in a total of 60 individuals. Cytogenetic analyzes were performed with roots of six adult individuals from six populations, collected and kept in cultivation. In flow cytometry analyzes, the average value of DNA content for *Stigmatodon costae* was 1.542 pg. In the populations of *S. goniorachis* the average DNA content in individuals from Morro da Babilônia was 1.553 pg, and in Pico da Tijuca it was 1.550 pg. In the population of *S. francae* the average was 1.597 pg. In the populations of *Stigmatodon sp. nov.*, in Pão de Açúcar the value was 1.508 pg, and in Morro São João it was 1.485 pg. Cytogenetic analyzes showed identical values in the six populations of the *S. goniorachis* complex, with $2n = 50$ chromosomes. Flow cytometry analyzes did not show differences in the six populations of the four species that make up the *S. goniorachis* complex. These species have small genomes, as reported for other species of the Bromeliaceae family. The results of the chromosome number were similar in all six populations of the four species, and like most species of Bromeliaceae, it also has $2n = 50$ chromosomes. Therefore, the type of xeric habitat and the disjunct geographic distribution of the inselbergs where the populations of the *S. goniorachis* complex are established, are not influencing and / or altering the nuclear DNA content and the chromosome number in their different locations.

Keywords: Atlantic Forest, cytogenetics, cytometry, geographic isolation, rocky outcrop.

3.1 Introduction

The tropical and subtropical regions are home to most of the planet's biodiversity and plant endemism (Myers et al. 2000). In the Neotropics, the Bromeliaceae family stands out among Angiosperms due to the expressive variety of forms and environments occupied by their species, being an important example of adaptive radiation (Benzing 2000; Givnish et al. 2011). The family consists of eight subfamilies, 78 genera and approximately 3.657 species (Gouda & Butcher 2021 [cont. Upd]), whose representatives may be terrestrial, rupicolous or epiphytes, capable of occupying altitudes from sea level to the Cordillera dos Andes in different biomes (Smith & Downs 1974, 1977, 1979).

The subfamily Tillandsioideae comprises the largest number of species, with approximately 1.503 taxa (Gouda & Butcher 2021 [cont. Upd]), distributed in 23 genera (Barfuss et al. 2016; Leme et al. 2017), occurring throughout the entire family distribution area (Smith & Downs 1977; Zizka et al. 2020). Tillandsioides are among the bromeliads with the greatest adaptive capacity and can be found in different habitats, from mesic environments to xeric environments with little water availability (Barfuss et al. 2016).

Although phylogenies based on nuclear and chloroplast markers have provided a better understanding of the systematics of the subfamily Tillandsioideae (Barfuss et al. 2016), the Bromeliaceae family still has doubtful borders with regard to the evolutionary relationships between its species (Martinelli et al. 2008). Thus, the understanding of the evolution of reproductive isolation mechanisms has been a target of great interest in the family in recent years using different tools (e.g. Palma-Silva et al. 2011, Hmeljevski et al. 2014, 2015, 2017; Gonçalves-Oliveira et al. 2017; Manhães et al. 2019; Mota et al. 2019).

In the Bromeliaceae family, evolutionary processes such as speciation and hybridization are often found, possibly associated with their recent diversification, and

combined with the ability to occupy different environments (De Sousa et al. 2007; Versieux et al. 2012; Krapp et al. 2014 ; Goetze et al. 2016). Speciation and hybridization processes often occur by geographic division within populations, which can promote an evolutionary scale in a completely independent way, encompassing genetic separation, combined with morphological differentiation processes (Coyne & Orr 2004). Such processes may be the result of disjunct distributions and / or geographic isolation, ecological differentiation of environments and different morphological or behavioral characteristics, being deeply influenced by natural selection and population genetic drift (Petit & Excoffier 2009; Lavania 2020).

Bromeliaceae species occurring in inselbergs (isolated rocky outcrops that stand out in the landscape) of the Atlantic Forest are under strong pressure from these processes, due to the geographic isolation, “considered terrestrial islands” (Porembski & Barthlott 2000), and high endemism in this type environment (Smith 1955; Smith & Downs 1974; Benzing 2000; Martinelli et al. 2008; De Paula et al. 2016). Of typical occurrence in these areas, the genus *Stigmatodon* comprises 26 species that have rupicolous habitat occurring in the slopes of the inselbergs of the Atlantic Forest and in rocky outcrops of the rupestrian fields (Couto et al. In prep.). In this domain, the genus presents the species *S. brassicoides* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss, *S. costae* (B.R.Silva & Leme) Leme, G.K.Br. & Barfuss, *S. francae* D.R. Couto, Manhães & A.F. Costa, *S. goniorachis* (Baker) Leme, G.K.Br. & Barfuss and *Stigmatodon sp. nov.*, of restricted distribution in Atlantic Forest inselbergs and that occur exclusively in the metropolitan region of Rio de Janeiro, southeastern Brazil (Manhães et al. in prep.).

Thus, the present work aims to apply flow cytometry and cytogenetics tools in samples from six populations of these four species of the genus *Stigmatodon* endemic to inselbergs in the Atlantic Forest. Flow cytometry and cytogenetic analysis are important tools to assist approaches to phylogeny, taxonomy, genetic diversity, reproductive biology, chromosomal characterization and evolution in Bromeliaceae (Ramírez & Brown 2001; Favoreto et al. 2012; Gitaí et al. 2014; Moura et al. 2018). Species distributed in isolate in xeric environments such as inselbergs may present differences in

content and / or chromosome number as reported by Gitaí et al. (2005) and Nunes et al. (2013). Based on these characteristics, we aim to determine the average nuclear DNA content and characterize the karyotype of these four species in their different populations, in addition to contributing to the genome and evolution database of species of the Bromeliaceae family.

3.2 Material and methods

3.2.1 Study species

The four species that are the focus of this work, *S. costae*, *S. francae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon sp. nov.* (Figure 1) make up the *S. goniorachis* complex, and are endemic to inselbergs in the eastern Atlantic Forest occurring exclusively in the metropolitan region of Rio de Janeiro, in southeastern Brazil. In addition to these four species, the complex also includes *S. brassicoides* totaling five species. The species *S. brassicoides* was not analyzed due to the difficulty of access to its populations, and the low number of individuals distributed in the inselbergs it occupies, which made the sampling unfeasible. So far, *S. costae* and *S. francae* are restricted and occur in only one location each. For *S. brassicoides* and *Stigmatodon sp. nov.*, two locations are known. *Stigmatodon goniorachis* has a wider distribution, occurring in several inselbergs in this region. The sampling of this work included individuals belonging to six populations representing the four species under study, one from *S. costae* and *S. francae*, two from *S. goniorachis*, and two from *Stigmatodon sp. nov.* (Table 1, Figure 2).

Fertile individuals were collected and pressed according to the usual plant taxonomy procedures, and included in the collections of the Herbarium of the National Museum (R).



Figure 1. Species of *Stigmatodon* under study. A, B – *S. costae*; C, D - *S. francae*; E, F - *S. goniorachis*; G, H - *Stigmatodon sp. nov.* (Photos: V.C. Manhães).

Table 1. Sampled populations of the four species of the *Stigmatodon goniorachis* complex under study, with their collection sites and geographic parameters.

Locality, Municipality (locality code)	Táxon	Elevation (m.s.m)	Coordinates
Morro do Tucum, Niterói (MT)	<i>S. costae</i>	79	22°58'25"S 43°01'36"O
Pedra Hime, Rio de Janeiro (PH)	<i>S. francae</i>	270	22°55'50"S 43°24'46"O
Morro Babilônia, Rio de Janeiro (MB)	<i>S. goniorachis</i>	90	22°57'22"S 43°10'09"O
Pico da Tijuca, Rio de Janeiro (PT)	<i>S. goniorachis</i>	850	22°56'36"S 43°17'18"O
Pão de Açúcar, Rio de Janeiro (PA)	<i>Stigmatodon sp. nov.</i>	106	22°57'02"S 43°09'16"O
Morro São João, Rio de Janeiro (MSJ)	<i>Stigmatodon sp. nov.</i>	132	22°57'40"S 43°10'51"O

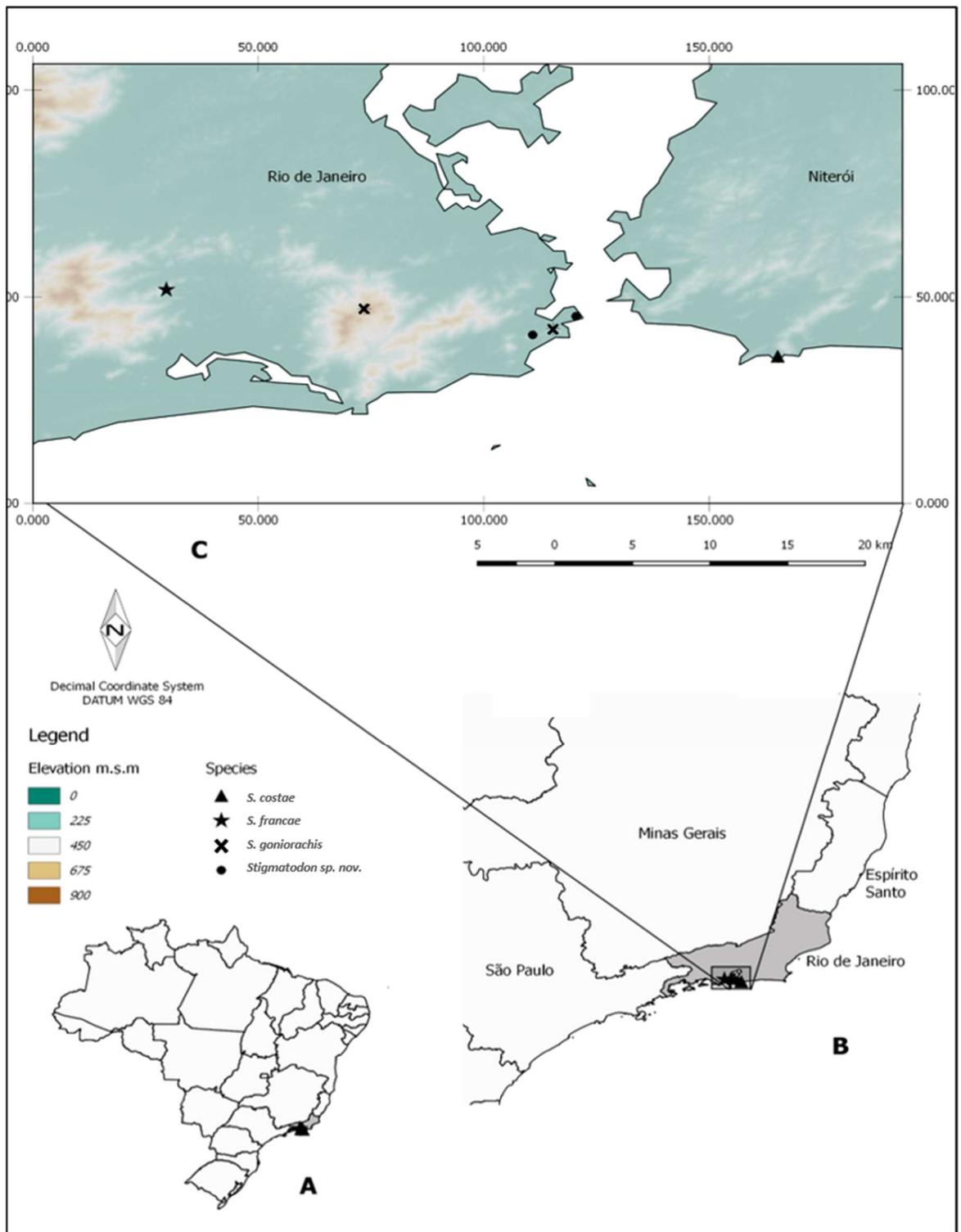


Figure 2. Distribution of collection sites for the four species of the *Stigmatodon goniorachis* complex in the metropolitan region of Rio de Janeiro. A- Brazil, B- Southeast Region, C- Cities of Rio de Janeiro and Niterói.

3.2.2 Flow cytometry analysis – FCM

Leaves from ten individuals of each population were collected from six populations, one from *S. costae* and *S. francae* and two from *S. goniorachis* and *Stigmatodon sp. nov.*, with a total of 60 individuals used in the analysis. As the primary standard, *Solanum lycopersicum* L. 'Stupicke' (reference standard for FCM, 2C = 2.00 pg; Praça-Fontes et al. 2011) was used. Flow cytometry procedures were performed according to (Otto 1990, Nunes et al. 2013). Nuclear suspensions were analyzed with a Partec PAS flow cytometer (Partec GmbH, Munster, Germany), equipped with a laser source (488 nm). The fluorescence of propidium iodide (PI, Sigma®, USA) was recorded using an RG 610 nm filter. The cytometry histograms were analyzed using the FlowMax program version FCS 2.0 (Partec®, Germany). The nuclear DNA content was calculated for all individuals of the *S. goniorachis* complex as recommended by (Doležel et al. 2003).

3.2.3 Cytogenetic analysis

The material used for cytogenetic analysis was obtained from roots of adult individuals, representing the six populations of the *S. goniorachis* complex, which were collected in their places of occurrence and kept in cultivation simulating their natural environment. The roots were excised and treated with amiprophos-methyl microtubule inhibiting agent (APM, Nihon Bayer Agrochem K. K.®) with a final concentration of 4 µM for a period of 4 hours. Subsequently, the roots were washed with distilled water for 20 minutes and then fixed in a methanol: acid acid solution (Merck®, Germany) (3: 1). The fixator was replaced in three stages, and the samples were stored at -20 °C (Carvalho et al. 2007). The roots were washed and incubated for 2h, 2: 30h, 2: 45h and 3h, at 34 °C, in pectinase solution (Sigma®, USA) in the proportions of 1:5, 1: 8, 1:10, 1:12, 1:13, 1:14 or 1:15 (enzyme: water). After enzymatic maceration, the roots were washed for 10 min in distilled water, fixed and stored at -20 °C (Carvalho et al. 2007; Clarindo & Carvalho 2008, Nunes et al. 2013). The preparation of the slides was performed by dissociating the root meristem. The slides were dried in air and on a hot plate at 50 °C (Carvalho et al. 2007). Subsequently, the slides were stained with a 5% solution of Giemsa (Merck®, Germany) in phosphate buffer (pH 6.8) for 20 min, washed twice in

distilled water and air dried, and then placed on a heating plate at 50 °C for 5 min. The images of the metaphase chromosomes were captured using a gray 8-bit CCD camera (Nikon, Japan), coupled to a Nikon 80i microscope (Nikon, Japan) equipped with a Nikon Pan 100x, a fluorine oil immersion objective with numerical aperture of 1.30 and a flat achromatic condenser with an opening of 0.7. The microscope was attached to a Pentium Intel Core i5 computer (Termaltake-Asus, Brazil) with Nis-Elements 3.0 imaging software (Nikon, Japan).

3.3 Results

3.3.1 Flow cytometry analysis – FCM

The results showed fluorescence peaks of G0 / G1 nuclei of *Stigmatodon costae*, *S. francae*, *S. goniorachis*, *Stigmatodon sp. nov.* and *Solanum lycopersicum* (basis of comparison) with coefficient of variation (CV) less than 5%. By comparing the midpoints of the G0 / G1 peaks of each sample and the internal standard (*Solanum lycopersicum*), the mean value 2C for *S. costae* in the Morro do Tucum locality was 1.542 ± 0.023 pg. In *S. francae* in Pedra Hime the average was 1.597 ± 0.029 pg. In *S. goniorachis* in Morro da Babilônia it was 1.553 ± 0.023 pg, and in Pico da Tijuca it was 1.550 ± 0.025 pg, In *Stigmatodon sp. nov.* the average DNA content of individuals from Pão de Açúcar were 1.508 ± 0.013 pg, respectively, and from Morro São João, 1.485 ± 0.016 pg. (Figure 3).

3.3.2 Cytogenetic Analysis

Cytogenetic analyzes revealed that all individuals from the six populations that comprise the four species (*S. costae*, *S. francae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon sp. nov.*) have a chromosome number equivalent to $2n = 50$. This chromosome number of the sampled individuals corroborates with the results obtained from flow cytometry, showing that there is no evident variation in the chromosome number between the species studied in their different populations (Figure 4).

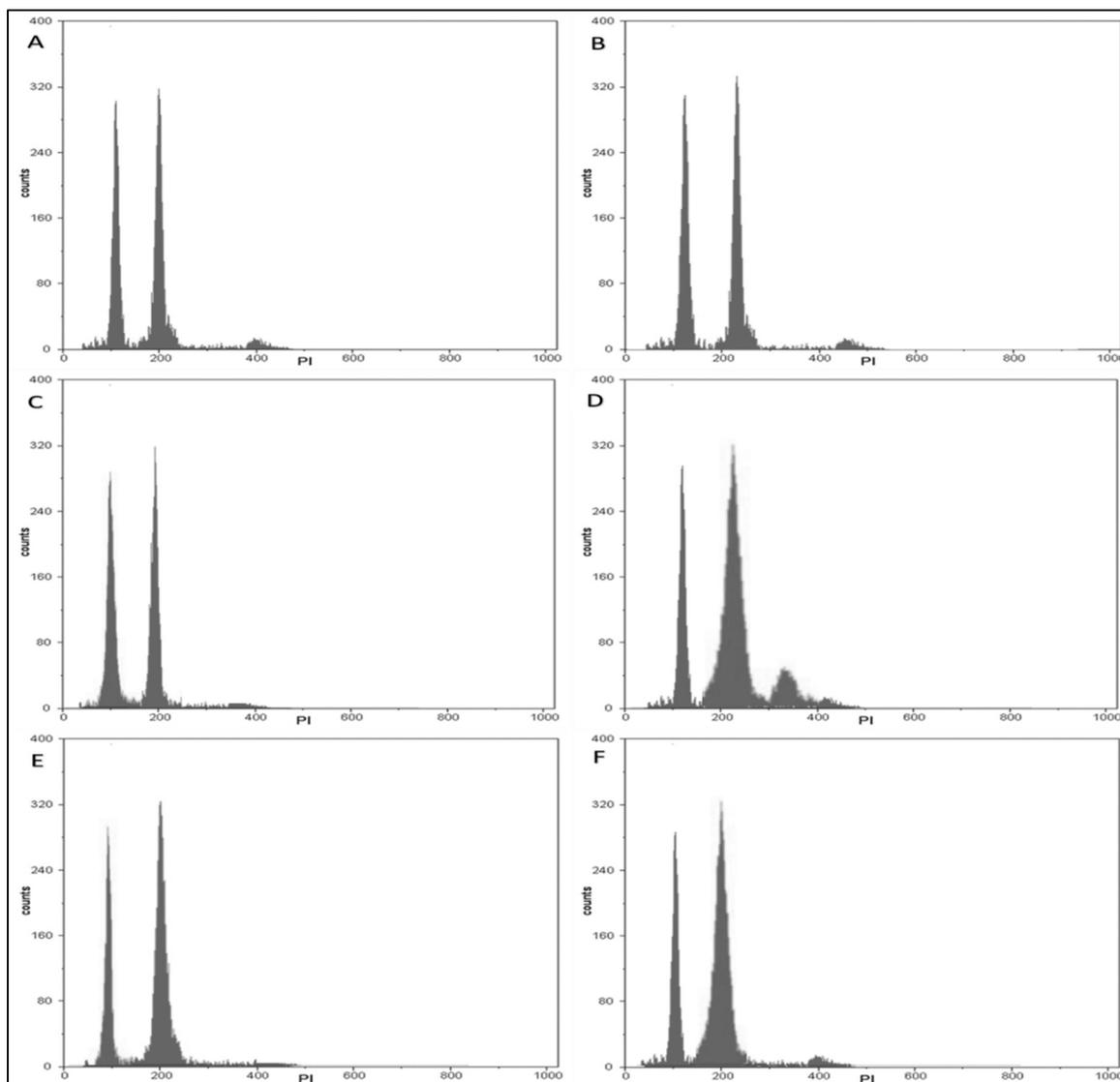


Figure 3. Histograms showing the G0 / G1 peaks of: A- *Stigmatodon costae* (MT) in the channel 111 (2C = 1.54 pg) in and *Solanum lycopersicum* in the channel 200 (padrão, 2C = 2.00 pg); B- *Stigmatodon francae* PH in the channel 122 (2C = 1.59 pg) in and *Solanum lycopersicum* in the channel 221 (2C = 2.00 pg); C- *Stigmatodon goniorachis* (MB) in the channel 100 (2C = 1.55 pg) in and *Solanum lycopersicum* in the channel 189 (2C = 2.00 pg); D- *Stigmatodon goniorachis* (PT) in the channel 119 (2C = 1.55 pg) in and *Solanum lycopersicum* in the channel 209 (2C = 2.00 pg); E- *Stigmatodon sp. nov.* (PA) in the channel 117 (2C = 1.50 pg) in and *Solanum lycopersicum* in the channel 202 (2C = 2.00 pg); F- *Stigmatodon sp. nov.* (MSJ) in the channel 101 (2C = 1.50 pg) in and *Solanum lycopersicum* in the channel 199 (2C = 2.00 pg).

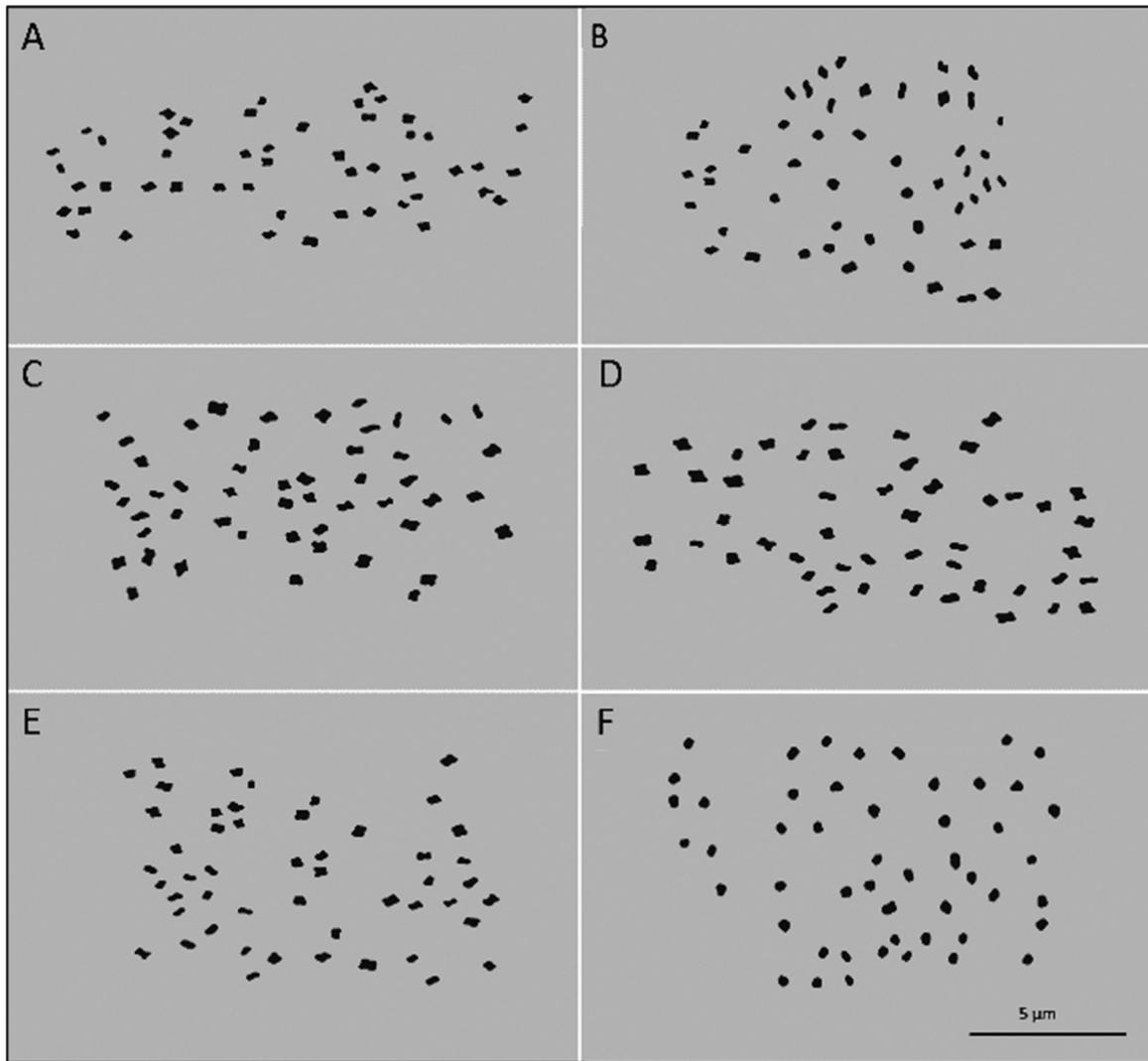


Figure 4. Metaphases of the four species of *Stigmatodon* in six different populations presenting $2n = 50$ chromosomes. (A) *Stigmatodon costae* – MT, (B) *S. francae* – PH, (C) *S. goniorachis* – MB, (D) *S. goniorachis* – PT, (E) *Stigmatodon sp. nov.* – PA and (F) *Stigmatodon sp. nov.* – MSJ. Karyotypes are made up of relatively small metacentric and submetacentric chromosomes.

3.4 Discussion

The results found in our study are unprecedented for the genus *Stigmatodon*. Here, we provide the average size of nuclear DNA for four of the 26 species that make up the genus *Stigmatodon*. These species are part of the *Stigmatodon goniorachis* complex, which occurs exclusively in coastal inselbergs in the metropolitan region of Rio de Janeiro (Couto et al. In prep).

The average value of the nuclear DNA content found for the four species of *Stigmatodon* (*S. costae*, *S. francae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon sp. nov.*) presented by all individuals from the six locations, corroborates the values reported for the Bromeliaceae family (Zonneveld et al. 2005; Favoreto et al. 2012; Bennett & Leitch, 2012; Gitaí et al. 2014; Moura et al. 2018; Gonçalves-Oliveira et al. 2019; Müller et al. 2019). It was also observed that there is little variation in the average DNA content in the four species. The individuals from the analyzed locations showed small differences in the DNA content in members of the same area, and the results of the variation coefficient were less than 5%, indicating that the values found are homogeneous. The small variation observed may be the result of secondary metabolites present in these individuals, possibly caused by the environment where they are established.

The results obtained in our analyzes on the species of *Stigmatodon*, mainly agree with taxa inserted in genera of the same subfamily (Tillandsioideae), as reported by (Zonneveld et al. 2005; Favoreto et al. 2012; Gitaí et al. 2014; Müller et al. 2019). These studies revealed a variation in the size of the nuclear DNA content ranging from $2C = 0.88 - 1.52$ pg in *Catopsis*, $2C = 1.09 - 1.71$ pg in *Guzmania* (Gitaí et al. 2014; Müller et al. 2019), $2C = 0.80 - 3.34$ pg in *Tillandsia*, $2C = 0.95 - 2.29$ pg, in *Vriesea* (Zonneveld et al. 2005; Favoreto et al. 2012; Gitaí et al. 2014; Müller et al. 2019). A similar value was also found by Gitaí et al. (2014) in *Racinea ropalocarpa* (André) M.A. Spencer & L.B.Sm. with $2C = 1.27$ pg. Therefore, the species of *Stigmatodon* analyzed here have nuclear DNA content similar to that of other species in the same subfamily, mainly in relation to the genus *Vriesea*, sister group and from where the species of *Stigmatodon* were segregated (Barfuss et al. 2016).

As found in the four analyzed species, the FCM data have shown that the Bromeliaceae family is composed of species that have relatively low nuclear DNA content (Leitch et al. 2010; Nunes & Clarindo 2014; Müller et al. 2019). The average values found in the four species of *Stigmatodon* in our study are consistent with the general notion of small genome sizes in tropical plants (Levin & Funderburg 1979; Chase et al. 2005). Bromeliaceae species that have relatively low nuclear DNA content may have been shaped by ecological factors such as temperature (Müller et al. 2019). The species of this family that express small genomes, seem to be able to occupy a wider range of habitats and, concomitantly, present ideal features at high temperatures in nutrient-poor environments, when compared to species that have large genomes (Knight & Ackerly 2002; Knight et al. 2005; Cruz et al. 2019; Müller et al. 2019). Cells need nitrogen and phosphorus to produce nucleic acids and therefore species that express larger genomes need more of these nutrients when compared to smaller genome species, which reduces competition in environments with high temperatures and poor nutrients (Pellicer et al. 2018). In addition, smaller genomes are related to a smaller cell size, with faster rates of mitosis and meiosis and consequently germination, reducing the generation time of the species, resulting in the adaptation of environments in a short time (Pandit et al. 2014). This fact may be occurring in the *Stigmatodon* species, which occur in inselbergs that are subject to high temperatures, which may have favored the occupation of these species in this type of habitat. However, further studies must be carried out in order to corroborate this possible environmental influence on the size of the plant genome (Doyle & Coate 2019).

As with nuclear DNA content analysis, the chromosome number was first analyzed for the genus *Stigmatodon*, and encompassed four species that make up the *Stigmatodon goniorachis* complex. The number of chromosomes found in the four species analyzed in this study corroborates that observed for most species in the Bromeliaceae family (Cotias-de-Oliveira et al. 2000, 2004; Ramírez-Morillo & Brown 2001; Palma-Silva et al. 2004; Bellintani et al. 2005; Gitai et al. 2005, 2014; Ceita et al. 2008; Louzada et al. 2010; Nunes et al. 2013; Nunes & Clarindo 2014; Gonçalves-Oliveira et al. 2019). All individuals of the four species of *Stigmatodon* in our analysis

(*S. costae*, *S. francae*, *S. goniorachis* and *Stigmatodon* sp. nov.) presented chromosome number $2n = 50$. All analyzes were performed on individuals with DNA content ranging from $2C = 1.48 - 1.59$ pg, indicating that the chromosome number does not change in its different locations of occurrence.

In studies with species of the subfamily Tillandsioideae, belonging to the genera *Alcantarea*, *Catopsis*, *Guzmania*, *Racinea*, *Tillandsia*, *Vriesea* and *Werauhia*, several authors reported that most of the 41 species studied presented $2n = 50$ (Cotias-de-Oliveira et al. 2004; Palma-Silva et al. 2004; Ceita et al. 2008; Gitai et al. 2014). Therefore, the pattern observed in other subfamily genera is also found in *Stigmatodon*. Our results corroborate mainly with those found by Cotias-de-Oliveira et al. (2004) and Palma-Silva et al. (2004) in species included in *Vriesea*, which is the genus closest phylogenetically to *Stigmatodon*.

The species of *Stigmatodon* in this study occur exclusively in inselbergs of the Atlantic Forest, these environments have peculiar characteristics such as high geographic isolation and xeric habitats, characterized by the low availability of water and the occurrence of a high degree of sunshine (Barow & Meister 2003; Porembski 2007; Couto 2017). These environmental conditions can interfere with the control of the cell cycle, resulting in chromosomal alteration events, such as auto-polyploidization (Barow & Meister 2003). However, the results found in this study, suggest that despite the type of environment and the geographic isolation where they are inserted, the species studied here did not have their chromosome number changed.

Therefore, the results obtained in the present study demonstrate that the analyzed *Stigmatodon* species contain a chromosome number equivalent to the general pattern found in the Bromeliaceae family. This pattern is observed mainly when compared with species of the subfamily Tillandsioideae, and that the geographic isolation and the type of xeric environment is not affecting the chromosomal composition of the four species of the *Stigmatodon goniorachis* complex.

3.5 Conclusion

The results of flow cytometry did not show significant differences in the average nuclear DNA content in the populations of the four species of the *Stigmatodon goniorachis* complex in our study. These results are similar to those reported for species inserted in the same subfamily of the genus *Stigmatodon* (Tillandsioideae). In addition, the average nuclear DNA contents found showed small genomes, and corroborate the values detected for other species of the Bromeliaceae family.

Cytogenetic analyzes revealed that the species of the *S. goniorachis* complex under study have a chromosome number equivalent to that observed for most species of the Bromeliaceae family. Like the results of average nuclear DNA content, the chromosome number does not change in the different populations of *Stigmatodon* analyzed here. These results corroborate those found for the subfamily Tillandsioideae, mainly with species belonging to the genus *Vriesea*, from which the genus *Stigmatodon* was recently dismembered.

Therefore, we have shown in the present study that the type of xeric environment, isolation, and disjunct geographic distribution, characteristic of inselbergs where species of the *S. goniorachis* complex are established, are not influencing and / or altering the average nuclear DNA content. This is also reflected in the chromosome number of these four species, which did not change in the different populations analyzed.

Bibliographic references standardized according to the journal *Molecular Biology Reports*.

3.6 References

- Barfuss MHJ, Till W, Leme EMC, Pizón JP, Manzanares JM, Halbritter H, Samuel R, Brown GK (2016) Taxonomic revision of Bromeliaceae subfm. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* 279: 001–097.
- Barow M, Meister A (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell Environ* 26: 571–584.
- Bellintani MC, Assis JG, Oliveira ALC (2005) Chromosomal evolution of Bromeliaceae. *Cytologia* 70: 129–133.
- Bennett MD, Leitch IJ (2012) Nuclear DNA amounts in angiosperms - targets, trends and tomorrow. *Ann Bot* 107: 467-590
- Benzing DH (2000) *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Carvalho CR, Clarindo WR, Almeida PM (2007) Plant cytogenetics: still looking for the perfect mitotic chromosomes. *Nucleus* 50: 453–462.
- Ceita GO, Assis JGA, Guedes MLS, Cotias-de-Oliveira ALPC (2008) Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. *Bot J Linn Soc* 158: 189-193.
- Chase MW, Hanson L, Albert VA, Whitten WM, Williams NH (2005) Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Ann Bot* 95: 191–199.
- Clarindo WR, Carvalho CR (2008) First *Cofea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Syst Evol* 274: 237–241.

- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Bellintani MC, Andrade JCS, Guedes MLS (2000) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genet Mol Biol* 23: 173–177.
- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Ceita O, Palmeira ACL, Guedes MLS (2004) Chromosome number for Bromeliaceae species occurring in Brazil. *Cytologia* 69: 161-166.
- Couto DR (2017) Revisão taxônomica e filogenia de *Stigmatodon* Leme, G.K BR. & Barfuss (Bromeliaceae – Tillandsioideae). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional. Tese de doutorado.
- Couto DR, Kessous IM, Neves B, Paixão-Souza B, Faria CG, Barfuss MHJ, Salgueiro F, Sá-Haidad, Costa AF. (In prep.) Molecular phylogenetics and character evolution in *Stigmatodon* (Bromeliaceae, Tillandsioideae), an endemic genus to Brazilian rocky outcrops. *Bot J Linn Soc*.
- Coyne JA & Orr HA (2004) Speciation. Sunderland, MA: *Sinauer Associates*.
- Cruz GAS, Filho JRM, Vasconcelos S, Gitaí J, Campos JMS, Viccini LF, Zizka G, Leme EMC, Brasileiro-Vidal AC, Benko-Iseppon AM (2019) Genome size evolution and chromosome numbers of species of the cryptanthoid complex (Bromelioideae, Bromeliaceae) in a phylogenetic framework. *Bot J Linn Soc* 192: 887–899.
- De Paula LFA, Forzza RC, Neri AV, Bueno ML, Porembski S (2016) Sugar Loaf Land in south-eastern Brazil: a centre of diversity for mat-forming bromeliads on inselbergs. *Bot J Linn Soc* 181: 459–476.
- De Sousa LOF, Wendt T, Brown GK, Tuthill DE, Evans TM (2007) Monophyly and phylogenetics relationships in *Lymania* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on morphology and chloroplast DNA sequences. *Syst Bot* 32: 264–270.
- Doležel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51: 127–128.

- Doyle JJ & Coate JE (2019) Polyploidy, the Nucleotype, and Novelty: The Impact of Genome Doubling on the Biology of the Cell. *Int J Plant Sci* 180:1–52.
- Favoreto FC, Carvalho CR, Lima ABP, Ferreira A, Clarindo WR (2012) Genome size and base composition of Bromeliaceae species assessed by flow cytometry. *Plant Syst Evol* 298: 1185–1193.
- Gitai J, Horres R, Benko-Iseppon AM (2005) Chromosome features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Syst Evol* 253: 65–80.
- Gitai J, Paule J, Zizka G, Schulte K, Benko-Iseppon AM (2014) Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. *Bot J Linn Soc* 176: 349–368.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Benjamin EEV, Riina R, Schulte K, Horres R., Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98: 872–895.
- Goetze M, Schulte K, Palma-Silva C, Zanella CM, Büttow MV, Capra F, Bered F (2016) Diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae) in the Brazilian Atlantic rainforest: A case study in *Aechmea* subgenus *Ortigiesia*. *Mol Phylogenet Evol* 98: 346–357.
- Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Krapp F, Alves M, Wanderley MGL, Weising K (2017) Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *Am J Bot* 104(6): 1-11.
- Gonçalves-Oliveira RC, Ximenes AF, Oliveira AR, Vasconcelos S, Carvalho-Filho N, Oliveira G, Campos JMS, Brasileiro-Vidal AC, Viccini LF, Benko-Iseppon AM (2019) Genome size and chromosome number conservation contrasting with

- karyotype diversity in *Hohenbergia* (Bromelioideae, Bromeliaceae). Bot J Linn Soc 192(4): 900–909.
- Gouda EJ, Butcher D. (cont. updated) *Encyclopaedia of Bromeliads, Version 4*. <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> University Botanic Gardens, Utrecht (accessed: 27/01/2021).
- Hmeljevski KV, Freitas L, Domingues R, Pereira AR, Cancio AS, Andrade ACS, Machado MA, Viccini LF, Forzza RC (2014) Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. *Flora* 209: 250–259.
- Hmeljevski KV, Reis MS, Forzza RC (2015). Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. *J Hered* 106(1): 93–101.
- Hmeljevski KV, Wolowski M, Forzza RC, Freitas L (2017). High outcrossing rates and short-distance pollination in a species restricted to granitic inselbergs. *Aust J Bot* 65(4): 315–326.
- Knight CA, Ackerly DD (2002) Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecol Lett* 5: 66–76.
- Knight CA, Molinari NA & Petrov DA (2005) The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Ann Bot* 95: 177–190.
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, Weising K (2014) Phylogeny and Evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Syst Evo.* 300: 1591–1614.
- Lavana UC (2020) Plant speciation and polyploid: in habitat divergence and environmental perspective. *Nucleus*. doi: 10.1007/s13237-020-00311-6.

- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF (2010) Genome size dynamics and evolution in monocots. *J Bot.* doi: 10.1155/2010/862516.
- Leme EMC, Halbritter H. & Barfuss MHJ (2017) *Waltillia*, a new monotypic genus in Tillandsioideae (Bromeliaceae) arises from a rediscovered, allegedly extinct species from Brazil. *Phytotaxa* 299(1): 1–35.
- Levin D, Funderburg S (1979) Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. *Am Nat* 114: 784–795.
- Louzada RB, Palma-Silva C, Corrêa AM, Kaltchuk-Santos E, Wanderley MGL (2010) Chromosome number of *Orthophytum* species (Bromeliaceae). *Kew Bull* 65: 53–58.
- Manhães VC, Miranda FD, Clarindo WR, Carrijo TT (2019). Genetic diversity and karyotype of *Pitcairnia azouryi*: an endangered species of Bromeliaceae endemic to Atlantic Forest inselbergs. *Mol Biol Rep* 47: 179–189.
- Manhães VC, Couto DR, Salgueiro F, Costa AF (*in prep*) Morphological and genetic evidence on the *Stigmatodon goniorachis* complex (Tillandsioideae, Bromeliaceae), reveals a new species of inselbergs from the Atlantic Forest.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC (2008). Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59(1): 209–258.
- Moura MN, Forzza RC, Cristiano MP (2018). Reconstruction of ancestral genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae): what can genome size tell us about the evolutionary history of its five genera? *Bot J Linn Soc* 186: 321–333.
- Mota MR, Pinheiro F, Leal BSS, Wendt T, Palma-Silva C (2019) The role of hybridization and introgression in maintaining species integrity and cohesion in naturally isolated inselberg Bromeliads populations. *Plant Biol* 21: 122–132.

- Müller LB, Zotz G, Albach DC (2019) Bromeliaceae subfamilies show divergent trends of genome size evolution. *Sci Rep* 9: 5136.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca, GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nunes ACP, Nogueira EU, Gontijo ABPL, Carvalho CR, Clarindo WR (2013) The first karyogram of a Bromeliaceae species: an allopolyploid genome. *Plant Syst Evol* 299: 1135–1140.
- Nunes ACP, Clarindo WR (2014) Karyotype characterization and nuclear DNA content measurement in Bromeliaceae: State of the art and future perspectives. *Ann Braz Acad Sci* 86(4): 1849–1861.
- Otto FJ (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Robinson JP (eds) *Methods in cell biology* 33. Academic Press, San Diego, pp 105–110.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay M F, Cozzolino S, Lexer C (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Mol Ecol* 20: 3185–3201.
- Palma-Silva C, Santos DG, Kaltchuk-Santos E, Bodanese-Zanetini MH (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Bot* 91: 804–807.
- Pandit MK, White SM, Pockock MJ (2014) The contrasting effects of genome size, chromosome number and ploidy level on plant invasiveness: a global analysis. *New Phytol* 203: 697–703.
- Pellicer J, Hidalgo O, Dodsworth S, Leitch IJ (2018) Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes* 9: 88

- Petit RJ & Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends Ecol Evol* 24(7): 386–393.
- Porembski S. & Barthlott W (2000) Inselbergs: biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. *Ecol Stud* 146, Berlin.
- Porembski S. (2007) Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Rev Bras Bot* 30 (4): 579–586.
- Praça-Fontes MM, Carvalho CR, Clarindo WR, Cruz CD (2011) Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Rep* 30: 1183–1191.
- Ramírez-Morillo & Brown GK (2001) The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Syst Bot* 26: 722–726.
- Smith LB (1955) The Bromeliaceae of Brazil. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 126: 751–1290.
- Smith LB, Downs RJ (1974) *Flora Neotropica*, Monograph No.14, Part 1, Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York. p.1–658.
- Smith LB, Downs RJ (1977) *Flora Neotropica*, Monograph No. 14, Part 2, Tillandsioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York. p. 663–1942.
- Smith LB, Downs RJ (1979) *Flora Neotropica* Monograph No.14, Part 3, Bromelioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York, p.1493–2142.
- Versieux LM, Barbara T, Wanderley MDGL, Calvente A, Fay MF, Lexer C (2012) Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. *Mol Phylogenet Evol* 64: 177–189.

Zizka A, Azevedo J, Leme E, Neves B, Costa AF, Cáceres D, Zizka G (2020) Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). *Divers Distrib* 26(2): 183–195.

Zonneveld BJM, Leitch IJ, Bennet D (2005) First nuclear DNA amounts in more than 300 Angiosperms. *Ann Bot London* 96: 229–244.

Considerações Finais

No presente estudo, as abordagens morfológicas, citogenéticas e genéticas nos revelaram e nos permitiram ampliar o conhecimento de *Stigmatodon* nos *inselbergs* da Floresta Atlântica. Além disso, os dados apresentados são inéditos para o gênero, e nos trouxeram informações importantes sobre a caracterização e circunscrição das espécies que compõem o complexo *S. goniorachis*.

Para as nossas análises, primeiramente utilizamos a técnica de transferibilidade de marcadores moleculares microssatélites, que está presente no primeiro capítulo. Esta é uma forma relativamente mais prática e menos onerosa de investigar a diversidade e a estrutura genética de populações, além de reduzir consideravelmente o tempo necessário para a elaboração de *primers* específicos. Os resultados da transferibilidade de marcadores previamente desenvolvidos para outras espécies de Bromeliaceae foram positivos, dos 24 primers testados, 12 geraram ampliações positivas nas espécies do complexo *S. goniorachis*. Esses resultados nos permitiram investigar características genéticas das espécies em questão, como a diversidade e estrutura genética populacional. Além disso, esses marcadores microssatélites podem ser usados em futuras investigações com outras espécies do gênero *Stigmatodon*.

Com a intenção de avaliar a possibilidade de diferenças no conteúdo de DNA nuclear ou no número de cromossomos das espécies do complexo *S. goniorachis*, realizamos análise de citometria de fluxo, e análise citogenética. A distribuição restrita e disjunta do complexo *S. goniorachis* nos ambientes xéricos dos *inselbergs*, pode resultar em diferenças no conteúdo de DNA nuclear e no número cromossômico dessas espécies. No entanto nossos resultados evidenciaram, que apesar da forma de distribuição restrita e isolada em ambientes xéricos, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de DNA nuclear, e também não houve variação no número de cromossomos, com todas as espécies estudadas apresentando $2n = 50$. As análises de citometria de fluxo e citogenética contribuem significativamente para ampliar o banco de dados sobre a

família, principalmente para o gênero *Stigmatodon*, tendo em vista que ainda são poucos os estudos deste tipo nos ambientes dos *inselbergs*. Além disso, pode contribuir para futuras análises envolvendo essas espécies.

Pela proximidade morfológica entre as espécies do complexo *S. goniorachis*, conhecer a variação morfológica e genética foi crucial para obtenção de modelos sobre a diversidade dessas espécies nos *inselbergs*. As análises morfológicas são correlacionadas com as análises genéticas e indicaram a separação das quatro espécies, além da formação de dois grupos distintos nas populações de *S. goniorachis*, o que levou a classificação de um novo táxon, *S. carioca sp. nov.* Os resultados genéticos indicaram que apesar de apresentar poucas populações e distribuídas de forma restrita e pontual, as espécies do complexo *S. goniorachis* apresentaram níveis moderados-altos de diversidade genética, o que pode estar relacionado com a história de vida destes táxons. Os resultados das análises morfométricas e genéticas revelaram a existência de duas espécies distintas nas populações previamente identificadas como *S. goniorachis*, o que pode ter relação com fatores ambientais, considerando a localização das populações no *inselberg*, com algumas voltadas para o sul, e outras voltadas para o norte. Também não podemos descartar as características da semente, do néctar floral, da ação dos polinizadores, e das barreiras pré e pós-zigóticas. Além disso, todas as espécies de nosso estudo estão enquadradas em algum grau de ameaça de acordo com a IUCN. Nesse sentido, abordagens referentes à biologia reprodutiva, fisiologia e ecologia das espécies do complexo *S. goniorachis* são necessárias para tentar compreender de forma mais contundente o modo de vida dessas espécies. Igualmente para a flora dos *inselbergs* da Floresta Atlântica, que apesar das condições peculiares, são importantes refúgios para a biodiversidade de uma vegetação exclusiva. Portanto, nossos resultados revelam a importância dos estudos morfológicos e genéticos para avaliação da diversidade e compreensão dos mecanismos e padrões envolvidos nos traços morfológicos e moleculares destas espécies ocorrentes exclusivamente nos *inselbergs*.

Material Suplementar

Material Suplementar 1.1. Matriz de descrição informando cada variável quantitativa e qualitativa analisada pela população de cada uma das quatro espécies do estudo. Em negrito os códigos de cada população e de cada variável analisada.

Local/Var.	LSL	LSW	LBL	LBW	ITL	PED	PBL	PBW	IML	FBL	FBW	RCL	RCD	SPL	SPW	PTL	PTW	STL	PSL	LVC	PTC	LTR	LLP	IBP	FBC	LFM
MT	5,3	8,3	1,2	23,3	46,2	0,26	2,6	1,2	2,9	1,9	1,6	0,5	0,53	2,0	1,2	3,4	1,2	2,6	2,8	0	0	0	0	0	1	1
MT	4,8	7,4	1,1	21,2	37,6	0,29	2,9	1,3	2,6	2,0	1,8	0,5	0,46	2,0	1,8	3,3	1,7	2,5	2,8	0	0	0	0	0	1	1
MT	6,7	9,2	1,5	23,0	48,2	0,31	3,2	1,6	2,4	1,6	1,7	0,6	0,48	2,2	1,3	3,6	1,5	2,6	2,9	0	0	0	0	0	1	1
MT	7,0	9,8	1,7	25,5	52,1	0,38	3,6	1,9	3,2	2,2	1,9	0,6	0,55	2,3	1,9	3,8	1,5	2,5	2,7	0	0	0	0	0	1	1
MT	5,8	7,9	1,4	24,3	38,9	0,34	3,1	1,4	2,8	1,8	1,7	0,5	0,50	2,1	1,4	3,4	1,4	2,6	2,9	0	0	0	0	0	1	1
PA	7,0	10,5	1,7	16,8	40,1	0,41	2,9	1,7	2,1	1,9	2,5	0,4	0,56	2,1	1,3	3,0	1,6	2,6	2,9	0	0	1	0	0	1	1
PA	6,6	8,8	1,8	20,2	41,8	0,38	2,3	1,7	2,2	2,0	2,7	0,5	0,60	2,0	1,6	3,3	1,4	2,5	2,8	0	0	1	0	0	1	1
PA	7,8	12,3	2,4	22,5	55,6	0,39	2,9	1,7	3,2	2,2	2,7	0,4	0,52	2,2	1,6	3,4	1,7	2,6	2,9	0	0	1	0	0	1	1
PA	6,4	8,0	1,8	18,8	40,7	0,33	2,0	1,5	2,0	1,8	2,5	0,4	0,53	2,0	1,3	3,0	1,4	2,7	3,0	0	0	1	0	0	1	1
PA	7,9	9,2	2,2	23,3	58,7	0,43	3,0	1,9	3,5	2,4	2,8	0,6	0,62	2,3	1,8	3,6	1,9	2,6	2,9	0	0	1	0	0	1	1
MB	6,9	9,4	1,9	20,5	47,8	0,48	2,5	1,4	1,8	1,8	2,5	0,8	0,68	2,2	1,7	3,5	1,7	2,1	2,5	1	1	1	0	1	1	0
MB	5,1	9,0	1,8	20,1	50,3	0,46	2,6	1,5	2,0	1,9	2,3	0,6	0,59	2,0	1,5	3,1	1,6	2,4	2,7	1	1	1	0	1	1	0
MB	6,3	11,1	1,9	22,9	52,9	0,49	2,8	1,4	2,3	2,0	2,2	0,5	0,62	1,9	1,7	3,3	1,5	2,6	2,9	1	1	1	0	1	1	0
MB	6,4	10,4	1,4	27,5	61,7	0,42	3,1	1,7	2,7	2,1	2,2	0,6	0,58	2,0	1,4	3,0	1,4	2,6	2,8	1	1	1	0	1	1	0
MB	5,9	10,8	1,7	23,8	54,2	0,45	2,9	1,7	2,0	1,8	2,4	0,7	0,60	2,1	1,5	3,2	1,5	2,4	2,7	1	1	1	0	1	1	0
PT	7,2	10,1	1,9	26,8	50,2	0,49	2,9	1,6	2,0	1,7	2,2	0,7	0,50	2,0	1,5	3,4	1,5	2,3	2,5	1	1	1	0	1	1	0
PT	5,5	8,5	1,7	24,3	52,3	0,51	2,6	1,4	1,8	1,8	2,4	0,6	0,59	2,3	1,6	3,1	1,7	2,2	2,4	1	1	1	0	1	1	0
PT	6,5	9,1	2,0	26,7	65,4	0,49	2,7	1,5	1,6	2,0	2,5	0,5	0,61	1,9	1,5	3,2	1,7	2,4	2,7	1	1	1	0	1	1	0
PT	6,4	7,4	1,6	25,5	63,2	0,48	2,5	1,7	2,5	1,9	2,0	0,7	0,57	2,0	1,7	3,5	1,4	2,2	2,5	1	1	1	0	1	1	0
PT	7,0	9,4	1,8	27,8	79,1	0,50	3,0	1,7	2,7	2,5	2,6	0,8	0,59	2,4	1,7	3,6	1,8	2,5	2,7	1	1	1	0	1	1	0

Material Suplementar 1.2. Matriz de descrição informando cada variável quantitativa e qualitativa analisada pela população de cada uma das quatro espécies do estudo. Em negrito os códigos de cada população e de cada variável analisada.

Local/Var.	LSL	LSW	LBL	LBW	ITL	PED	PBL	PBW	IML	FBL	FBW	RCL	RCD	SPL	SPW	PTL	PTW	STL	PSL	LVC	PTC	LTR	LLP	IBP	FBC	LFM
MSJ	6,7	12,2	2,5	22,5	43,3	0,41	3,1	1,3	2,3	2,8	2,1	0,58	0,45	2,7	1,6	3,6	1,7	2,7	3,0	0	0	1	0	0	1	1
MSJ	5,9	12,0	2,2	17,7	42,7	0,53	3,3	1,2	2,4	2,8	2,2	0,58	0,43	2,6	1,5	3,6	1,8	2,8	3,1	0	0	1	0	0	1	1
MSJ	8,6	14,3	3,4	23,6	46,4	0,45	3,1	1,2	3,0	2,7	2,4	0,61	0,43	2,8	1,3	3,8	2,0	2,9	3,2	0	0	1	0	0	1	1
MSJ	6,0	11,2	2,6	18,8	47,8	0,50	3,3	1,3	2,7	2,9	2,1	0,70	0,51	2,7	1,5	3,7	1,9	2,7	3,0	0	0	1	0	0	1	1
MSJ	8,2	14,5	3,7	25,6	43,5	0,42	3,2	1,4	2,2	2,8	2,2	0,63	0,41	2,6	1,3	3,8	2,1	2,8	3,0	0	0	1	0	0	1	1
PH	9,2	14,7	3,4	33,0	113,9	1,4	3,7	2,1	1,5	3,6	4,5	1,6	0,70	3,0	2,2	4,5	1,4	4,1	3,9	1	1	1	0	2	0	0
PH	7,4	12,5	2,6	38,2	91,0	1,3	3,4	2,1	3,1	2,6	2,9	1,1	0,60	2,8	1,8	4,7	1,6	4,3	4,1	1	1	1	0	2	0	0
PH	7,8	12,5	2,7	37,6	114,5	1,5	3,6	2,2	2,4	3,6	3,9	1,5	0,60	2,9	2,4	4,6	1,5	4,3	4,4	1	1	1	0	2	0	0
PH	8,3	13,4	3,1	35,7	109,2	1,5	3,7	2,1	3,3	3,0	4,0	1,8	0,70	3,1	2,3	4,5	1,5	4,4	4,3	1	1	1	0	2	0	0
PH	10,3	15,4	3,8	41,3	118,8	1,7	3,9	2,5	3,1	3,9	4,3	1,8	0,90	3,3	2,6	4,8	1,7	5,0	4,7	1	1	1	0	2	0	0
PG	8,0	4,5	1,5	10,7	12,1	0,31	1,7	1,2	1,5	1,8	1,2	0,8	0,53	2,4	1,4	5,1	1,5	4,9	5,1	1	0	1	1	0	1	1
PG	9,3	5,5	2,2	12,1	13,0	0,32	1,9	1,7	1,8	1,9	1,3	0,7	0,43	2,9	1,5	5,0	1,6	4,7	5,0	1	0	1	1	0	1	1
PG	8,8	5,5	2,7	13,2	14,1	0,42	1,9	1,7	1,8	2,0	1,5	0,8	0,51	3,3	1,6	4,9	1,4	4,6	4,9	1	0	1	1	0	1	1
PG	10,9	6,5	2,8	15,1	15,2	0,41	2,0	1,2	2,0	2,1	1,5	0,7	0,49	3,1	1,5	4,9	1,5	4,8	5,1	1	0	1	1	0	1	1
PG	9,1	4,5	2,5	16,0	16,2	0,50	2,5	1,3	1,6	2,2	1,7	0,7	0,50	2,1	1,4	5,0	1,6	4,8	5,1	1	0	1	1	0	1	1

Material Suplementar 2. Caracterização dos oito marcadores microsatélites nucleares transferidos para *Stigmatodon costae*, *S. francae*, *S. goniorachis* e *Stigmatodon carioca* *sp. nov.*

<i>Loci</i>	<i>A</i>	<i>A_r</i>	<i>A_p</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	<i>F_{is}</i>
VgG02	20	11.999	6	0.668	0.518	0.218
VgF02	17	10.280	3	0.66	0.743	-0.118
VgA04	13	10.881	4	0.777	0.543	0.296
VgC01	4	3.829	0	0.548	0.434	0.203
VgB10	17	10.916	7	0.683	0.577	0.158
ACPTC138A	9	7.641	2	0.67	0.881	-0.309
Pit8	10	7.863	1	0.525	0.563	-0.066
CT5	14	10.390	3	0.604	0.573	0.054
Média	13	9.224		0.642	0.604	0.06

Material suplementar 3. Resultados das análises realizadas no software BOTTLENECK 1.2.02 no modelo “one-tailed Wilcoxon signed-ranked test” nas populações das espécies que compõem o complexo *S. goniorachis*. MT – Morro do Tucum (*S. costae*), PA – Pão de Açúcar (*S. goniorachis*), MB – Morro da Babilônia (*S. goniorachis*), PT – Pico da Tijuca (*S. goniorachis*), MSJ – Morro São João (*S. goniorachis*), PH – Pedra do Hime (*S. francae*).

Espécie - Localidade	Mean_N	Mean_K	Mean_He	p_W_1t_SMM
<i>S. costae</i> – MT	44.00	4.13	0.550	0.843
<i>S. goniorachis</i> – PA	48.00	5.13	0.628	0.962
<i>S. goniorachis</i> – MB	48.00	5.00	0.663	0.421
<i>S. goniorachis</i> – PT	48.00	5.00	0.649	0.679
<i>S. goniorachis</i> – MSJ	40.00	5.25	0.591	0.972
<i>S. francae</i> – PH	46.00	7.25	0.762	0.371