

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

Filogeografia e diversidade genética de *Aechmea caudata* (Lindm.) e *A. winkleri* (Reitz) (Bromeliaceae): implicações taxonômicas

Márcia Goetze

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Dra. Fernanda Bered

Porto Alegre, fevereiro de 2010.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Genética da UFRGS, Porto Alegre, Brasil e no Laboratório de Análise Genética e Molecular na Universidade de Campinas, São Paulo. O projeto foi subvencionado pelo Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Edital Universal 2008), pela International Foudation of Science (IFS – 2008) e pela Fundação O Boticário de Proteção À Natureza (Edital 2008/1). A mestranda obteve bolsa de estudos do CNPq (24 meses).

*Aos meus pais, Arnilo e Liris, e a minha irmã Karin,
E em especial ao meu namorado, Christian*

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Fernanda Bered, pela orientação, confiança, compreensão e amizade.

Aos meus pais, Arnilo e Liris, pelo estímulo, compreensão e apoio. Obrigada pelo suporte durante as saídas a campo e à minha mãe, obrigada pela ajuda nas coletas.

Ao meu namorado, Christian, sem o qual eu não teria conseguido, pelo amor, paciência, compreensão e confiança. Obrigada pela ajuda nas intermináveis saídas a campo à procura de populações de *Aechmea winkleri* em Santa Cruz e Rio Pardo.

À equipe de amigos do Núcleo Genética e Conservação de Plantas, Gecele Paggi, Camila Zanella, Miriam Büttow, Manuela Bruxel, Jamilla Sampaio, Felipe Grillo e Aline Janke, pela ajuda nas saídas a campo, nas discussões sobre o que é uma *Aechmea caudata*, pela ajuda no laboratório, pela convivência, exemplos e compreensão.

À Clarisse Palma da Silva, pelo companheirismo, estímulo, ajuda na saída a campo para o Rio de Janeiro, e pelas longas conversas e discussões sobre filogeografia.

Às professoras Maria Helena Zanettini, Márcia Margis, Luciane Passaglia e Eliane Kaltchuk dos Santos, pelo apoio científico, convivência e contribuições para o bom funcionamento do laboratório.

Ao professor Nelson Fagundes pela revisão deste manuscrito.

À Andréia Zolet, pelas dicas nas análises de filogeografia.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, em especial a Gisele, Carol, Bea, Adri, Alexandro, Marta, Rico, João, Samanta, Ane, Fernanda, Rafael O., Rafael A., Beto, Andréia e Lauro, pelo companheirismo, risadas, conversas e convivência durante estes dois anos.

À amiga Márcia Alexsandra, que me acolheu em Porto Alegre, pelo apoio, estímulo, companheirismo, paciência e ótimas reflexões sobre o futuro....

Aos colegas dos Laboratórios de Ensino de Biologia e Anatomia Humana, o Bloco 20, da Universidade de Santa Cruz do Sul, Lu, Dani, Deivis, Clara, Gabi, Manoel e Antonieta, pela força, estímulo e amizade e por me ajudarem na difícil decisão de pedir demissão para realizar o mestrado.

Aos meus orientadores da graduação, professora Gladis e professor Alexandre, por me fazerem tomar gosto pela pesquisa e por sempre terem me incentivado a continuar....

Aos professores Maurício Sedrez dos Reis e Ademir Reis e seus alunos, Diogo e Thiago (Montanha), pelo auxílio nas saídas a campo em Santa Catarina.

Aos professores Rodrigo Kersten, Rosângela Tardivo e Annette Bonnet e a funcionária da prefeitura de Guaratuba, Nina, pelo auxílio e dicas nas saídas a campo no Paraná.

À professora Maria das Graças Wanderley pelas dicas na identificação das *Aechmeas* e ao seu aluno, Rafael Louzada, e sua noiva, Maria, pelo auxílio nas saídas a campo em São Paulo.

Aos professores Gustavo Martinelli e seus alunos, Miguel e Eduardo, e a professora Tânia Wendt, pelas dicas e auxílios nas coletas no Rio de Janeiro.

À Bióloga Emilin Corrêa pelo auxílio na procura por *Aechmeas* em Rio Pardo.

À Luciane Gobbi, pelo empréstimo do paquímetro.

Ao Elmo e à Ellen, pela ajuda na resolução de diversos problemas.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pelo apoio financeiro para realização de algumas saídas a campo.

Ao Alexandre Rieger, pela autorização de coleta no Pinus Parque.

A Secretaria do Meio Ambiente e Saneamento de Santa Cruz do Sul, pela autorização de coletas no Cinturão Verde.

Ao senhor comandante da primeira Brigada de Artilharia Anti-Aérea, Praia Grande, SP, pela autorização de coletas na Fortaleza de Itaipu.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

MUITO OBRIGADA!!!!

Sumário

Resumo	8
Abstract	10
Capítulo 1: 1. Introdução Geral.....	12
1.1 A família Bromeliaceae.....	13
1.2 <i>Aechmea caudata</i> e <i>Aechmea winkleri</i>	14
1.3 Objetivos.....	17
Capítulo 2: Filogeografia comparada de <i>Aechmea caudata</i> e <i>A. winkleri</i> (Bromeliaceae): delimitação taxonômica e história evolutiva.....	19
2.1 Introdução.....	20
2.2 Materiais e métodos.....	22
2.3 Resultados.....	25
2.4 Discussão.....	27
Capítulo 3: Isolamento de locos de microssatélites de <i>Aechmea winkleri</i> Reitz (Bromeliaceae), uma espécie endêmica do Rio Grande do Sul.....	45
Capítulo 4: Variabilidade genética e morfológica em populações de <i>Aechmea winkleri</i> (Bromeliaceae): uma espécie endêmica e ameaçada da Mata Atlântica.....	51
4.1 Introdução.....	52
4.2 Materiais e métodos.....	53
4.3 Resultados.....	57
4.4 Discussão.....	59
Capítulo 5: Considerações Finais.....	71
Capítulo 6: Referências Bibliográficas.....	74

Resumo

O Brasil abriga cerca de 50% das espécies de bromélias, sendo o leste brasileiro o centro de diversidade para a subfamília Bromelioideae. *Aechmea caudata* e *A. winkleri* são espécies endêmicas da Mata Atlântica, ameaçadas de extinção, fazendo parte de um grupo de difícil delimitação taxonômica do subgênero *Ortgiesia*. Elas são preferencialmente saxícolas, apresentam flores de pétalas amarelas, com alta taxa de reprodução clonal. Com o objetivo de entender o relacionamento entre *A. caudata* e *A. winkleri*, foram realizadas análises filogeográficas, baseadas em microssatélites plastidiais, e análises morfológicas (**Capítulo 2**). Oitenta e seis indivíduos de *A. caudata* e 59 de *A. winkleri* foram amostrados ao longo de toda a distribuição geográfica das espécies, totalizando 13 populações. Os resultados obtidos revelaram o compartilhamento de 12 dos 41 haplótipos detectados e a formação de dois clados distintos, um para cada espécie, a partir das análises morfológicas. Apesar dos resultados obtidos suportarem parcialmente a classificação de *A. caudata* e *A. winkleri* como duas espécies distintas, a complexa rede filogeográfica encontrada indica que mais estudos se fazem necessários para o completo entendimento do relacionamento dessas taxa. Com a análise dos padrões biogeográficos, duas regiões para *A. caudata* e uma para *A. winkleri* foram sugeridas como possíveis refúgios durante as oscilações climáticas do Quaternário. Uma biblioteca de microssatélites nucleares foi construída para a espécie *A. winkleri*, sendo nove pares de “primers” desenhados (**Capítulo 3**). Estes marcadores foram testados em 20 indivíduos de quatro populações, porém sem obtenção de um padrão claro e polimórfico de amplificação para nenhum loco. No **Capítulo 4**, foram descritos os padrões de diversidade genética e estruturação populacional para *A. winkleri*, utilizando três locos heterólogos de microssatélites nucleares. Foram amostradas quatro populações, totalizando 142 indivíduos. Os resultados indicaram índices de diversidade genética semelhantes aos encontrados para outras espécies de bromélias ($H_O = 0,556$ e $H_E = 0,630$). A riqueza alélica média foi de 3,6 alelos por loco. As populações de *A. winkleri* apresentaram uma estruturação moderada ($F_{ST} = 0,082$), com um número de migrantes variando entre 1,654 e 4,933 indivíduos por geração. As populações apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com um

coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) médio de 0,152. A conectividade entre as populações, o sistema de cruzamento alógamo e a dispersão das sementes por pássaros podem ser os responsáveis pelos altos índices de diversidade encontrados e pela homogeneização das populações de *A. winkleri*.

Abstract

Brazil is home to about 50% of bromeliads species and the eastern Brazilian region is the diversity center for the Bromelioideae subfamily. *Aechmea caudata* and *A. winkleri* are endemic and endangered species of the Atlantic Rainforest. These species are part of a group with taxonomic delimitation problems of the subgenus *Ortgiesia*. They are preferably saxicolous having flowers with yellow petals and high clonal reproduction. In order to understand the relationship between *A. caudata* and *A. winkleri*, phylogeographic analysis based on plastid microsatellite and morphological analyses were performed (**Chapter 2**). Eighty-six individuals of *A. caudata* and 59 of *A. winkleri* were sampled throughout the geographical distribution range of the species, totaling 13 populations. The results revealed that 12 out of the 41 haplotypes detected were shared between the two species and the morphological analysis indicated the formation of two distinct clades, one for each species. Although the results partially supported the classification of *A. caudata* and *A. winkleri* as two distinct species, the complex phylogeographic network found indicates that further studies are necessary for complete understanding of the relationship of these taxa. With the analysis of biogeographical patterns, two regions for *A. caudata* and one for *A. winkleri* were suggested as possible refuges during the Quaternary climate change. A library of nuclear microsatellites was constructed for *A. winkleri* and nine pairs of primers designed (**Chapter 3**). These markers were tested in 20 individuals from four populations, but without obtain a clear and polymorphic amplification pattern. In **Chapter 4**, the patterns of genetic diversity and population structure for *A. winkleri* were described using three heterologous nuclear microsatellite loci. We sampled four populations, totaling 142 individuals. The results indicated levels of genetic diversity close to others bromeliads species ($H_O = 0.556$ and $H_E = 0.630$). The averaged allelic richness was 3.6 alleles per locus. The populations of *A. winkleri* showed a moderate structure ($F_{ST} = 0.082$), with a number of migrants ranging from 1.654 to 4.933 individuals per generation. The populations showed significant deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium, with an averaged inbreeding coefficient (F_{IS}) of 0.152. The connectivity among populations, the allogamous mating system and seed dispersal by birds

may be responsible for the high levels of diversity found and the homogenization of *A. winkleri* populations.

Capítulo 1
Introdução Geral

1. Introdução Geral

1.1 A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 3.086 espécies distribuídas em 58 gêneros e três subfamílias: Pitcarnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae (Smith e Downs, 1974, 1977 e 1979; Luther, 2006). As bromélias possuem folhas dispostas em roseta, que possibilitam o acúmulo de água, ou folhas carnosas que funcionam como órgãos de reserva. Os tricomas foliares possibilitam a absorção de água e o desenvolvimento de várias estratégias para lidar com o estresse hídrico permitindo uma extraordinária versatilidade ecológica (Benzing, 2000). Apesar das bromélias serem conhecidas como plantas parasitas, suas raízes possuem função exclusiva de suporte e fixação (Benzing, 2000). Assim, podem ser encontradas em praticamente todos os ecossistemas neotropicais, desde o nível do mar, em praias, mangues e restingas, até altitudes de 5.000 m, nos Andes. Podem ser terrestres, epifíticas ou rupículas (Medina, 1990; Leme e Marigo, 1993).

Bromeliaceae é a maior família de plantas típicas do Novo Mundo, com distribuição geográfica restrita às Américas (limite norte de ocorrência nos estados da Virgínia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos, e limite sul no norte da Patagônia, na Argentina). A única exceção é *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr. que está localizada no Oeste da África, na região da Guiné (Porembski e Barthlott, 1999) e cuja localização parece ser decorrente de um evento recente de dispersão a longa distância (Givnish *et al.*, 2004). Informações oriundas de macro e microfósseis indicam a existência de representantes de Bromeliaceae a partir do Terciário médio (Benzing, 2000). O surgimento da família pode ser um fenômeno relativamente recente (Smith, 1934), devendo ter ocorrido no próprio Novo Mundo, como sugere sua distribuição continental restrita (Leme e Marigo, 1993). As bromélias provavelmente surgiram no norte da América do Sul, um ambiente que é geologicamente antigo, e que abriga espécies consideradas basais nas hipóteses filogenéticas existentes para o grupo (Benzing, 2000; Givnish *et al.*, 2004; Barfuss *et al.*, 2005). São considerados três centros de diversidade para a família: do norte dos Andes até o México e as Antilhas, o Planalto das Guianas e o leste do Brasil (Smith e Downs, 1974). O leste brasileiro,

representado pela Mata Atlântica, merece destaque por apresentar um grande número de espécies endêmicas (Leme e Marigo, 1993). Cerca de 50% das espécies de bromélias são nativas do Brasil.

Há muito tempo espécies da família Bromeliaceae vêm sendo utilizadas pelos povos nativos das Américas, estando fortemente presentes em suas culturas. Atualmente, mais de 90 espécies são utilizadas no mundo todo, para diversos fins: fibras, forragem, alimentação humana, rituais místicos, combustíveis, ornamentação, medicinais, cosméticos, entre outros (Bennet *et al.*, 2001). Apesar das características ornamentais desta família, o interesse pelo cultivo de bromélias para comercialização é considerado recente, do início dos anos 1990 (Bered *et al.*, 2008). A crescente demanda de mercado tem sido responsável pelo aumento da produção e comercialização de bromélias. No entanto, o extrativismo ilegal é responsável por reduzir drasticamente as espécies, principalmente aquelas de ciclos de vida longos. As plantas são coletadas tanto para abastecer o mercado interno como para serem exportadas e vendidas a colecionadores e produtores europeus e norte-americanos (Andrade e Demattê, 1999; Coffani-Nunes, 2002). Outro fator relevante que põe em risco espécies de bromélias é a destruição de seu habitat. A maioria das espécies ornamentais é encontrada na Mata Atlântica, um dos três ecossistemas mais ameaçados de extinção do mundo (Myers *et al.*, 2000).

1.2 *Aechmea caudata* e *Aechmea winkleri*

O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. ocorre desde o México e Antilhas até o Uruguai e Norte da Argentina (Reitz, 1983; Benzing, 2000). Cerca de 70% das espécies do gênero estão distribuídas no Brasil (Smith e Downs, 1979) e a Mata Atlântica é o centro de diversidade para *Aechmea* assim como para a maioria dos gêneros da subfamília Bromelioideae (Smith, 1934). Espécies do gênero *Aechmea*, assim como seus híbridos, estão entre as bromélias mais cultivadas para a comercialização como plantas ornamentais (Cathcart, 1995).

Aechmea caudata Lindm. (Figura 1) apresenta folhas de 40 a 105 cm de comprimento, geralmente arroxeadas com margem serrilhada. Inflorescência composta na base ou até cerca da metade, simples para o ápice. Flores sésseis de 20 a 28 mm de comprimento; sépalas vermelho-alaranjadas, levemente assimétricas; pétalas amarelas. Ovário subtrígono com óvulos dispostos na parte mediana do ovário (Smith e Downs, 1979; Wanderley e Martins,

2007). Segundo Ceita *et al.* (2008), *A. caudata* é diplóide com $2n = 50$ cromossomos. Esta espécie apresenta uma grande variação na coloração das flores (sépala) ao longo de sua distribuição geográfica. Alguns exemplos dessa variação podem ser observados na Figura 2. A distribuição geográfica da espécie estende-se do Rio Grande do Sul ao Espírito Santo de acordo com Smith e Downs (1979). *Aechmea caudata* está na lista de espécies ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul (SEMA: www.sema.rs.gov.br). Existe um único registro de ocorrência da espécie no estado, no município de Rio Pardo (Smith e Downs, 1979), entretanto, nas expedições científicas realizadas no estado, nosso grupo de pesquisa não encontrou nenhuma população ou exemplar dessa espécie.



Figura 1: *Aechmea caudata* Lindm.

Aechmea winkleri Reitz (Figura 3) apresenta folhas de 30 a 36 cm de comprimento, verdes, com margem serrilhada com espinhos de 0,5 mm de comprimento. Inflorescência bipinada na metade basal, simples para o ápice. Flores sésseis de 16 mm de comprimento; sépalas vermelhas, fortemente assimétricas; pétalas amarelas. Ovário subcilíndrico vermelho com 5 mm de comprimento (Smith e Downs, 1979). Esta espécie apresenta uma grande variação na forma da inflorescência, variando de simples a composta, mais larga ou mais comprida, ocorrendo, todas essas formas, na mesma população (Figura 4). *Aechmea winkleri*

está na lista de espécies ameaçadas do Brasil (IBAMA: www.ibama.gov.br). Atualmente são conhecidas sete populações dessa espécie, ocorrendo na região central do Rio Grande do Sul. O “status” de espécie de *A. winkleri* pode ser considerado controverso, principalmente pela sua recente descrição (Reitz, 1975) e restrita localização geográfica.



Figura 2. Exemplo na variação na coloração encontrada nas flores de *Aechmea caudata*. Nas fotos acima as plantas já estão em início de frutificação. A) *Aechmea caudata* em Florianópolis - SC; B) *Aechmea caudata* em Guaratuba - PR; C) *Aechmea caudata* em Itapoá - SC.

Aechmea caudata e *A. winkleri* são espécies do subgênero *Ortgiesia* no qual pode ser encontrado um complexo de espécies de difícil delimitação taxonômica. Além de *A. caudata* e *A. winkleri*, fazem parte do grupo *A. coelestis* (K. Kock) E Morren, *A. gracilis* Lindm. e *A. organensis* Wawra. Estas espécies são separadas por características como cor de sépala, pétala e ovário, além do tamanho de ovário e época de florescimento (Smith e Downs, 1979;

Wanderley e Martins, 2007). Como ocorre muita variação nessas características, às vezes a identificação das espécies se torna complexa. Além disso, as informações das fichas das exsicatas nos herbários geralmente não trazem informações a respeito da coloração das peças florais, gerando confusão.



Figura 3. *Aechmea winkleri* Reitz.

Aechmea caudata e *A. winkleri* são plantas com alto apelo ornamental, entretanto pouco se conhece sobre aspectos básicos, como sistema de reprodução, estrutura genética, padrões filogeográficos, fluxo gênico entre as populações, fenologia e até mesmo dados sobre a distribuição geográfica das espécies. Estes aspectos para estas duas espécies começaram a ser abordados pelo nosso grupo de pesquisa, com a presente dissertação e com uma tese de doutorado iniciada em 2008.

1.3 Objetivos

A presente dissertação está inserida em um projeto amplo que visa contribuir para os estudos genéticos e biológicos de plantas neotropicais, com ênfase na família Bromeliaceae. Esta dissertação teve como objetivos avaliar os padrões filogeográficos das espécies *A. caudata* e *A.*

winkleri para auxiliar na compreensão do relacionamento dessas duas espécies, corroborando ou não o “status” de espécie de *A. winkleri*; estimar a diversidade e estrutura genética de populações de *A. winkleri* ao longo de sua distribuição geográfica; e caracterizar a variação morfológica encontrada em *A. winkleri*. O conhecimento desses itens será de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo das populações de *A. caudata* e *A. winkleri* e de espécies relacionadas.



Figura 4. Variação morfológica observada em *Aechmea winkleri*. A) Inflorescência simples. B) Inflorescência na forma oval. C) Inflorescência composta na base. D) Inflorescência composta da base até o meio.

Capítulo 2

Filogeografia comparada de *Aechmea caudata* e *A. winkleri* (Bromeliaceae): delimitação taxonômica e história evolutiva

2.1 Introdução

Filogeografia é a área de estudo que trata dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas em nível intra-específico. A análise e interpretação da distribuição de linhagens, usualmente, requerem informações da genética molecular, genética de populações, filogenias, demografia, etologia e geografia histórica, sendo a filogeografia uma disciplina integrativa (Avice, 1998). Estudos filogeográficos têm sido utilizados para investigar os efeitos de mudanças climáticas do passado na estrutura genética de espécies animais e vegetais. Estes estudos permitem inferir sobre a evolução de espécies dentro de biomas, o que pode ser utilizado como subsídio para estratégias de conservação de espécies (Bermingham e Moritz, 1998; Ramos *et al.*, 2007).

Análises de filogeografia comparada permitem estudos detalhados da evolução da paisagem, incluindo a distribuição dos táxons através de uma região, os processos de especiação, radiação adaptativa e extinção (Bermingham e Moritz, 1998). Muitos trabalhos de filogeografia interespecífica abordam questões de delimitação taxonômica entre complexos de espécies animais (Morse e Farrel, 2005; Palma *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Grazziotin *et al.*, 2006; Pellegrino *et al.*, 2008; Zink *et al.*, 2009) e vegetais (Byrne *et al.*, 2002; Marcussen, 2003; Shaw e Small, 2005; Albach *et al.*, 2006; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Araki *et al.*, 2008).

A delimitação de espécies, processo pelo qual os limites entre um grupo de espécies são determinados e novas são descobertas, é um dos principais tópicos na sistemática moderna (Wiens, 2007), sendo novos métodos para a delimitação sugeridos (por exemplo, Knowles e Carstens, 2007). A unidade do conceito de espécie é um fator importante para a delimitação e evidências sugerem que a maioria dos pesquisadores concorda que elas podem ser consideradas linhagens (Wiens, 2007). Espécies são usadas como unidades fundamentais em diversos estudos, em análises biogeográficas, ecológicas, de macroevolução e na biologia da conservação, sendo necessário um melhor entendimento, mais objetivo e rigoroso, do que são espécies na natureza (Sites Jr e Marshall, 2003).

Aechmea caudata é uma espécie endêmica da Mata Atlântica “sensu strictu”, epífita, saxícola ou terrestre, ocorrendo do Rio Grande do Sul ao Espírito Santo (Smith e Downs, 1979). *Aechmea winkleri* é preferencialmente saxícola, apresenta uma distribuição geográfica extremamente restrita, podendo ser considerada endêmica da região central do estado do Rio Grande do Sul. Ambas as espécies pertencem ao subgênero *Ortgiesia*, que apresenta um complexo de espécies taxonomicamente problemático, cujos limites conceituais não são bem delineados (Smith e Downs 1979; Faria *et al.*, 2004; Horres *et al.*, 2007). Elas compartilham muitas características morfológicas, como por exemplo, cor de pétalas e sépalas (Smith e Downs, 1979), sobreposição do período de floração e também o compartilhamento de polinizadores (Büttow, em preparação), além de apresentarem uma grande variação morfológica na coloração das flores (*A. caudata*) e no tamanho da inflorescência (*A. winkleri*). Ainda, o “status” de espécie de *A. winkleri* pode ser considerado controverso, principalmente pela sua recente descrição (Reitz, 1975) e restrita localização geográfica. O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. agrupa cerca de 220 espécies, sendo o gênero mais amplo e diverso da subfamília Bromelioideae (Faria *et al.*, 2004). Apesar da monofilia da subfamília Bromelioideae ser bem suportada por dados morfológicos e moleculares (por exemplo, Givnish *et al.*, 2004; 2007), as relações inter e intragenéricas da subfamília são muito pouco compreendidas. A delimitação genérica dentro da subfamília é considerada problemática porque os caracteres morfológicos muitas vezes revelam-se homoplásticos e, portanto, deixam de delimitar grupos naturais, além de vários gêneros serem definidos por combinações únicas de caracteres ao invés de sinapomorfias tradicionais (Schulte *et al.*, 2009). O gênero *Aechmea* está dividido em oito subgêneros e problemas taxonômicos são evidentes (Faria *et al.*, 2004; Horres *et al.*, 2007). As características que separam os subgêneros não são muito consistentes, tornando, muitas vezes, o limite entre estes subgêneros imprecisos, observando-se espécies mal classificadas no respectivo subgênero ou mesmo no próprio gênero *Aechmea* (Smith e Downs, 1979; Wanderley e Martins, 2007). Desde a última monografia para a subfamília (Smith e Downs, 1979), o número de espécies descritas aumentou mais de um terço (Luther, 2006), sendo, portanto, uma revisão taxonômica necessária para este grupo (Martinelli *et al.*, 2008).

Numerosos estudos moleculares já foram realizados com intuito de resolver os problemas de delimitação genérica da subfamília Bromelioideae (Schulte *et al.*, 2005; Horres

et al., 2007; Schulte *et al.*, 2008; 2009). Nestes trabalhos muitos gêneros basais foram identificados, mas a relação entre eles não ficou resolvida. A monofilia do gênero *Aechmea* não é suportada em um estudo de filogenia baseado em caracteres morfológicos, assim como o relacionamento entre as espécies não é resolvido (Faria *et al.*, 2004), o mesmo ocorrendo nos estudos de filogenia baseados em marcadores plastidiais (Schulte *et al.*, 2005; Horres *et al.*, 2007; Schulte *et al.*, 2008). No trabalho realizado por Schulte *et al.* (2009), baseado em dados de marcadores plastidiais e nucleares, os autores observaram uma melhora significativa na resolução e no suporte de algumas relações intergenéricas reveladas, confirmando por exemplo, a monofilia dos subgêneros *Ortgiesia* e *Podaechmea*.

A análise de marcadores moleculares baseados em DNA de cloroplasto tem se mostrado uma ferramenta viável para estudos de filogeografia (King e Ferris, 1998) pelo fato de o DNA plastidial evoluir lentamente, ter baixa taxa de mutação e não sofrer recombinação (Wolfe *et al.*, 1987; Clegg e Zurawski, 1992). A descoberta de microssatélites polimórficos no cpDNA, fornece oportunidades para analisar a estrutura das populações e ajudar a responder questões filogeográficas em espécies de plantas (Provan *et al.*, 2001). Muitos estudos têm descrito níveis variáveis de polimorfismo no genoma de cloroplasto (Collevatti *et al.*, 2003; Lira *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Palma-Silva *et al.*, 2009).

No presente estudo foram utilizados quatro locos de microssatélites de cloroplasto para uma análise filogeográfica comparada de *A. caudata* e *A. winkleri*. O principal objetivo do trabalho foi compreender o relacionamento destas duas espécies, corroborando ou não o “status” de espécie de *A. winkleri*. Para auxiliar a responder esta questão foram avaliadas ainda características morfológicas quantitativas e qualitativas. Também foram discutidos aspectos biogeográficos e de conservação.

2.2 Material e métodos

Populações amostradas e extração de DNA

Para este estudo foram conduzidas coletas a campo entre julho de 2008 e maio de 2009. Inicialmente foram visitados os principais herbários nacionais para posterior delimitação dos

pontos de coleta, porém, muitas populações, para ambas as espécies, não foram mais encontradas a campo, provavelmente estando extintas nessas áreas em decorrência do crescente desmatamento da Mata Atlântica (Tabarelli *et al.*, 2005). Foram amostrados 86 indivíduos de *Aechmea caudata* do estado de Santa Catarina até o Rio de Janeiro. Nas expedições para as coletas não foram encontradas populações dessa espécie nos estados do Rio Grande do Sul e Espírito Santo, apesar de serem áreas descritas como de ocorrência de *A. caudata* (Smith e Downs, 1979). Para *A. winkleri* foram amostrados 59 indivíduos na região central do estado do Rio Grande do Sul, único local atualmente conhecido de ocorrência da espécie (Tabela 1; Figura 1). Para evitar a coleta de clones, já que as espécies apresentam alta reprodução clonal, foi mantida uma distância mínima de 1 metro entre os indivíduos amostrados.

Folhas jovens de cada indivíduo foram coletadas e estocadas em sílica gel ou nitrogênio líquido até a extração de DNA. O DNA genômico total foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10mg/ml), utilizando marcador de peso conhecido como referência.

Marcadores moleculares de cloroplasto e genotipagem

Um total de quatro microssatélites de cloroplasto (cpSSRs) previamente caracterizados para a espécie *Vriesea gigantea* (Palma-Silva *et al.*, 2009) foram utilizados no presente estudo. As amplificações foram realizadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador TC – 412 (Techne) contendo: 10 ng de DNA genômico, 1X de tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTP, 10 pmol de “primer forward” marcado com fluorescência 6-FAM, 10 pmol de “primer reverse” e 0,5 unidade de Taq polimerase (Taq Platinum - Invitrogen), com um volume final de 10 µl. O protocolo de amplificação utilizado está descrito em Palma-Silva *et al.* (2009). A genotipagem foi realizada em sequenciador automático (ABI 3700 Applied Biosystems) e o tamanho dos alelos foi confirmado utilizando o programa Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems).

Análise estatística

Os tamanhos dos fragmentos obtidos com a amplificação das regiões de cloroplasto definiram o haplótipo para cada indivíduo. As populações foram caracterizadas quanto aos níveis de diversidade utilizando: 1) o número de haplótipos encontrados, 2) H_E - diversidade gênica (Nei, 1978) e 3) riqueza alélica (El Mousadik e Petit, 1996), estimados através do programa Contrib 1.02 (Petit *et al.*, 1998).

Uma análise molecular da variância (AMOVA) foi realizada no programa GENALEX (Peakall e Smouse, 2006) para avaliar a distribuição da variação genética interespecífica. A significância de cada estatística F foi testada através de 9999 permutações no programa GENALEX.

Uma rede de haplótipos foi construída, baseada nos haplótipos de cpDNA, utilizando o programa Network 4.5 (disponível em www.fluxus-engineering.com), através do método “median-joining” (Bandelt *et al.*, 1999). A rede foi construída com os haplótipos que apresentaram uma frequência maior que um. Para todos os demais parâmetros, as configurações padrão foram utilizadas.

Análise morfológica

Vinte e duas características morfológicas quantitativas (Tabela 2) foram avaliadas em uma população (18 indivíduos) de *A. caudata* (CFLSC) e em todas as populações de *A. winkleri* (67 indivíduos). Somente uma população de *A. caudata* foi incluída nesta análise por ser a única com indivíduos com flores na época das coletas. As características avaliadas foram selecionadas de acordo com Vervaeke *et al.* (2004) e Costa *et al.* (2009). A área da inflorescência foi obtida multiplicando-se sua altura pela largura inferior da mesma. Já a densidade da inflorescência foi obtida dividindo-se o comprimento da inflorescência pelo número de flores. As características 1, 3 a 12 (Tabela 2) foram avaliadas a campo com auxílio de régua. Para a avaliação dos demais dados, uma flor aberta da base da inflorescência, de cada indivíduo, foi coletada e armazenada em álcool 70% a -20° C. As análises foram realizadas com auxílio de microscópio estereoscópico e paquímetro digital. Quatro caracteres morfológicos qualitativos também foram avaliados: cor da bráctea floral, cor da pétala, cor da

sépala e coloração da ponta da sépala, por serem características úteis na identificação e separação das espécies (Wanderley MGL, - comunicação pessoal).

Os dados quantitativos foram testados quanto a sua normalidade e submetidos a uma análise de variância (ANOVA). A significância das diferenças entre as médias foi testada através do teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas no programa SAS (versão 8, Instituto SAS, Cary, Carolina do Norte, USA). A população WPGRS não foi incluída nas análises devido ao baixo tamanho da amostra ($N = 7$).

Para análise simultânea das características quantitativas e qualitativas foi calculado o índice de Gower, coeficiente de similaridade entre indivíduos (Gower 1971), no programa Multiv 2.4 (Pillar, 2006), incluindo todas as populações acima mencionadas (CFLSC e todas da espécie *A. winkleri*). A partir deste índice foi realizada a construção de um dendrograma através do método UPGMA no programa NT-SYS 2.1 (Rohlf, 2000).

2.3 Resultados

Diversidade e diferenciação genética

Os quatro locos de microssatélites de cloroplasto descritos para a espécie *Vriesea gigantea* amplificaram satisfatoriamente em *Aechmea caudata* e *A. winkleri*, com uma pequena diferença no tamanho dos alelos. Foram detectados de três a 10 alelos em cada um dos locos avaliados (dados não mostrados). Quarenta e um haplótipos foram encontrados nas 13 populações amostradas, sendo 20 deles únicos. *Aechmea caudata* apresentou 35 haplótipos, sendo 15 únicos e *A. winkleri* apresentou 18 haplótipos com cinco deles únicos (Tabelas 3 e 4). Todas as populações mostraram-se polimórficas, apresentando de dois a 14 haplótipos cada (Tabela 3). As populações CFLSC, CGJSP e WUNRS mostraram-se as mais diversas com 14, 12 e nove haplótipos, respectivamente. As populações CPETRJ e CPGSP apresentaram dois e três haplótipos, respectivamente. As populações apresentaram níveis altos de diversidade gênica (H_E) variando de 0,667 a 1,000. Já a riqueza alélica variou de 1,000 a 2,000 (Tabela 3).

A rede de haplótipos, incluindo os quatro locos utilizados, está apresentada na Figura 2. *Aechmea caudata* e *A. winkleri* compartilham 12 haplótipos dos 21 que apresentaram uma

frequência maior que um em uma rede complexa. Oito haplótipos são únicos de *A. caudata* e somente um ocorre exclusivamente em *A. winkleri* (H16). Os haplótipos mais frequentes são, H23, H7 e H29. Todos os haplótipos diferem uns dos outros por somente um passo mutacional, com exceção dos haplótipos 14 e 16, que se diferenciam por dois passos.

As populações de *A. winkleri* compartilham haplótipos com as populações de *A. caudata*, principalmente com aquelas mais próximas (Santa Catarina) (Figura 1, Tabela 4). O H7 é o mais frequente em *A. winkleri*, sendo compartilhado somente com duas populações de *A. caudata*: CILSC e CFLSC, onde somente um indivíduo em cada local com este haplótipo foi encontrado. O mesmo ocorre para o H8, mais frequente em *A. winkleri*, ocorrendo em um único indivíduo na população CFLSC de *A. caudata*. O haplótipo mais frequente para *A. caudata* é o H29 que ocorre somente nas populações de Santa Catarina e de São Paulo. O H10 ocorre somente em populações de *A. caudata* de Santa Catarina, o H32 é exclusivo da população CMAPR, H36 é exclusivo de CPERJ e H38 ocorre somente nas populações do Paraná. A população CFLSC é a mais diversa para *A. caudata*, apresentando 14 haplótipos, sendo também a maior população encontrada, seguida pela população CGJSP que apresenta sete haplótipos únicos, com 12 haplótipos no total (todos os indivíduos desta população com haplótipos diferentes). Já para *A. winkleri* a população mais diversa foi a WUNRS com nove haplótipos e a população WPGRS apresenta o maior número de haplótipos únicos (Tabela 4).

A análise de variância molecular (AMOVA) entre as espécies analisadas mostrou que uma proporção da variação genética (12%) pode ser atribuída a variação entre populações dentro de espécies, e 10% da variação ocorre devido a diferenças entre espécies, enquanto a maior variação reside dentro de populações (78%, Tabela 5).

Varição morfológica

O dendrograma obtido a partir do índice de Gower, para as espécies em estudo, apresentou *A. caudata* e *A. winkleri* em grupos distintos (Figura 3). Para *A. winkleri* não foi possível observar a formação de grupos de acordo com as populações de origem dos indivíduos, por não existir uma identidade morfológica clara separando as populações. Das características quantitativas avaliadas, aquelas que apresentaram uma diferença pronunciada entre as espécies foram: 1, 3, 5, 7, 9 e 17, mostrando que *A. caudata* é ligeiramente maior que

A. winkleri (Tabela 2). Das características qualitativas, a coloração da ponta da sépala apresentou as maiores diferenças entre as duas espécies (Figura 4). A ponta da sépala de *A. caudata* apresentou sempre o mesmo tom da sépala, tons de alaranjado, enquanto a coloração da ponta da sépala das flores de *A. winkleri* sempre foi de cor verde, contrastando com a cor vermelha do restante da sépala.

2.4 Discussão

Diversidade genética

As populações de *Aechmea caudata* e *A. winkleri* apresentaram altos índices de diversidade genética (Tabela 3). Em estudo realizado por Palma-Silva *et al.* (2009), populações de *Vriesea gigantea* apresentaram valores de H_E que variaram de 0,118 a 0,772, com uma média de 0,486, sendo inferior ao encontrado no presente estudo (média de $H_E = 0,870$). Já a riqueza alélica encontrada neste estudo, que variou de 1,000 a 2,000, foi inferior à encontrada para *V. gigantea*, (0,412 a 2,810). As populações mais diversas de *V. gigantea* apresentaram cinco haplótipos, uma diversidade pequena comparada à encontrada em *A. caudata* com 14 haplótipos e mais similar àquela encontrada para *A. winkleri*, onde a população mais diversa apresentou nove haplótipos.

Aechmea caudata exibiu um grande número de alelos, 23 no total, muito diferente do que foi encontrado para *V. gigantea* (12 alelos), espécie para a qual os locos de microssatélites foram descritos (Palma-Silva *et al.*, 2009). Já *A. winkleri* apresentou menor diversidade, com 14 alelos (dados não mostrados). O genoma de cloroplasto de Bromeliaceae é considerado pouco variável, mesmo em nível intergenérico (Givnish *et al.*, 2004; Sgorbati *et al.*, 2004). Entretanto, devido ao grande número de regiões de cloroplasto de *V. gigantea* sequenciadas (21), em busca de polimorfismos (Palma-Silva *et al.*, 2009), foi encontrada variação suficiente para as análises filogeográficas e o presente estudo corrobora estes dados.

Variação morfológica, diferenciação populacional e haplótipos: implicações taxonômicas

Os resultados da análise morfológica revelaram claramente a separação das duas espécies (Figura 3), corroborando a classificação de Smith e Downs (1979). *Aechmea caudata* é ligeiramente maior que *A. winkleri*, além de apresentar diferenças na coloração de algumas estruturas, principalmente a ponta das sépalas das flores (Figura 4). Estudo realizado com o subgênero *Macrochordion* do gênero *Aechmea*, avaliando parâmetros morfológicos para a separação das espécies, apresentaram resultados úteis, sugerindo o agrupamento de algumas espécies antes descritas separadamente (Faria *et al.*, 2010). Para o complexo de espécies de *V. paraibica*, também foram realizadas análises morfométricas que se mostraram úteis na separação das espécies (Costa *et al.*, 2009), o mesmo ocorrendo para o estudo realizado para as espécies *Pitcairnia corcovadensis* e *P. flammea* (Wendt *et al.*, 2000). Estes resultados indicaram a importância das análises morfológicas para a elucidação de problemas taxonômicos envolvendo complexos de espécies e corrobora a necessidade de avaliação de características morfológicas qualitativas, além das quantitativas, como encontrado por Costa (2002), para a interpretação da delimitação de táxons muito relacionados. Porém não pode ser descartada a influência ambiental para as diferenças encontradas no presente estudo, uma vez que a população avaliada de *A. caudata* ocorre em uma região litorânea, em um local com maior luminosidade, em relação ao hábitat de *A. winkleri*, que ocorre no interior do continente em um ambiente com menor índice de luminosidade. Trabalhos que avaliaram a interferência de condições ambientais (por exemplo, luminosidade) em características morfológicas de espécies de bromélias encontraram que o comprimento das folhas é uma característica afetada (Freitas *et al.*, 2003; Lenzi *et al.*, 2006; Cavallero *et al.*, 2009), sendo maiores em ambientes mais sombreados. Porém, mais estudos se fazem necessário para poder esclarecer se as diferenças morfológicas encontradas podem ser interpretadas como variação ambiental ou não.

Os resultados obtidos a partir da análise de variância molecular (AMOVA) mostraram uma variação genética maior entre populações (12%) do que entre espécies (10%) (Tabela 5). O valor de $F_{RT} = 0,102$ entre espécies indicou uma estruturação moderada. Estes resultados da análise de variância molecular indicam não haver suporte para a separação em duas espécies distintas como proposto (Smith e Downs, 1979), sendo este resultado corroborado pelo valor moderado de fluxo gênico encontrado, o que indica que pode ter ocorrido contato entre as duas

espécies, uma vez que a distribuição geográfica atual delas não se sobrepõe (discutido no próximo parágrafo).

Dos 21 haplótipos com frequência maior do que um encontrados para *A. caudata* e *A. winkleri*, 12 são compartilhados entre elas (Figura 2 e Tabela 4). Destes, cinco (H7, H8, H11, H14 e H23) são mais frequentes em *A. winkleri*. Os haplótipos oito e 14 ocorrem em um indivíduo de *A. caudata* cada e o H7 ocorre em dois indivíduos dessa espécie. Já o H23 é o mais compartilhado, ocorrendo em nove indivíduos de *A. winkleri* e em seis de *A. caudata*. Quatro dos 12 haplótipos compartilhados entre as duas espécies são mais frequentes em *A. caudata*: H6, H24, H31 e H34. O haplótipo 24 ocorre em dois indivíduos de *A. winkleri* e os demais em um indivíduo cada. Este compartilhamento de haplótipos entre espécies pode ser devido a: 1) Homoplasia: o modelo de mutação dos microssatélites (através da perda ou ganho de uma unidade de repetição devido ao erro no reparo de mutações durante a replicação do DNA - Schlötterer e Tautz, 1992) pode levar a homoplasia por tamanho (Estoup *et al.*, 1995), ou seja, alelos idênticos em tamanho, mas não em sequência. A homoplasia por tamanho em microssatélites aumenta quando são comparadas populações muito divergentes (por exemplo, Estoup *et al.*, 1995; Culver, *et al.*, 2001). Como as filogenias realizadas até o momento para o grupo do qual fazem parte *A. caudata* e *A. winkleri* não apresentaram uma boa resolução (Faria *et al.*, 2004; Horres *et al.*, 2007), ou também não incluíram as duas espécies aqui estudadas (Schulte *et al.*, 2009), não é possível afirmar se elas são espécies irmãs ou espécies divergentes. Apesar da homoplasia aparentemente ser a explicação mais provável neste caso, muitos dos haplotipos compartilhados entre as espécies ocorrem em grande parte dos indivíduos (H6, H7, H8, H11, H23 e H24). 2) Hibridização: o gênero *Aechmea* faz parte de um grupo de bromélias muito jovem, tendo surgido em torno de 5 milhões de anos (Givnish *et al.*, 2007). A distribuição geográfica das duas espécies atualmente não se sobrepõe, sendo a ocorrência de *A. winkleri* restrita a região central do estado do Rio Grande do Sul, e a população mais próxima de *A. caudata* ocorre a aproximadamente 340 km de distância (Serra do Rio do Rastro, Santa Catarina). As duas espécies apresentam a morfologia floral muito semelhante (Smith e Downs, 1979), compartilham os mesmos polinizadores, além de apresentarem sobreposição na época do florescimento: *A. winkleri* floresce de março a maio e populações de *A. caudata* em Florianópolis também apresentam o mesmo período de floração

(Büttow, em preparação). Casos de hibridização natural são pouco documentados na família Bromeliaceae. Em um estudo realizado com 42 espécies simpátricas de bromélias, somente um híbrido putativo foi observado entre *A. araneosa* e *A. mutica*, representado por poucos indivíduos, sugerindo que barreiras pré-zigóticas como, diferenças no microhabitat, período de florescimento e especificidade do polinizador, não são eficientes para evitar a polinização interespecífica (Wendt, 2008). Entretanto, a ocorrência de hibridização natural entre *A. caudata* e *A. winkleri* parece algo muito difícil pelo fato da grande distância que as separa (340 km). Porém, não se descarta a hipótese de que ambas as espécies já ocorreram em regiões muito próximas, ou mesmo tinham uma área de ocorrência simpátrica, no passado. A área original de cobertura da Mata Atlântica "sensu strictu" se estendia até a região central do estado do Rio Grande do Sul (Morellato e Haddad, 2000), fazendo parte desta extensão original da Mata o local onde atualmente são encontradas as populações de *A. winkleri*. Além disso, existe uma única ocorrência registrada de *A. caudata* para o Rio Grande do Sul, também na região central do estado, no município de Rio Pardo (Smith e Downs, 1979), que dista cerca de 30 km do município de Santa Cruz do Sul, onde ocorre *A. winkleri*. Apesar da intensa procura no município de Rio Pardo, não foram encontradas populações de nenhuma das espécies em estudo. O registro da coleta de *A. caudata* no município de Rio Pardo é antigo, de 1925, e se a espécie realmente ali ocorria, foi extinta, sendo que este fato pode estar associado à destruição da Mata Atlântica na região, onde somente poucas áreas em recuperação são encontradas. Além disso, pode ter ocorrido um erro na identificação da espécie que ocorria em Rio Pardo, se tratando, na verdade, de *A. winkleri* e não *A. caudata*. Sendo assim, uma hipótese para explicar o compartilhamento de haplótipos entre *A. caudata* e *A. winkleri* é uma hibridização recente (cerca de 500 anos, quando o Brasil ainda não tinha sido ocupado), quando as duas espécies provavelmente ocorriam em simpatria. 3) Polimorfismo ancestral (uma única espécie): uma outra hipótese a ser considerada é a da ocorrência, no passado, de uma única espécie na região central do estado do Rio Grande do Sul, ao invés de duas. A região onde hoje se encontram as populações de *A. winkleri* pode ter sofrido algum tipo de mudança climática, ficando estas populações isoladas das demais, dando início a um processo de especiação. Este isolamento seria um processo extremamente recente, o que explicaria o atual padrão de compartilhamento de haplótipos, já que é sabido que o genoma de cloroplasto

em bromélias evoluiu a uma taxa excepcionalmente baixa (Givnish *et al.*, 2004). Porém, são necessários mais estudos para a confirmação desta hipótese.

Desta forma, apesar dos dados apresentados suportarem parcialmente a classificação de *A. caudata* e *A. winkleri* como duas espécies distintas, devido a complexa rede de haplótipos encontrada, mais estudos se fazem necessários para o completo entendimento do relacionamento dessas taxa. Uma abordagem que ainda será realizada é a inclusão da análise de microssatélites nucleares para a verificação de padrões de fluxo gênico recente entre as espécies (hibridização/ introgressão recentes). Evidências de marcadores nucleares, com uma taxa mais rápida de evolução, mostram-se interessantes para auxiliar na delimitação taxonômica e no relacionamento destas duas espécies, uma vez que análises filogenéticas realizadas baseadas em marcadores nucleares e plastidiais mostraram uma melhor resolução da delimitação de alguns gêneros para a subfamília Bromelioideae (Schulte *et al.*, 2009). Além disso, o uso de marcadores que apresentam altas taxas de fluxo gênico intraespecífico, parecem mais adequados para o uso em delimitação de espécies (Petit e Excoffier, 2009). Os autores citam, por exemplo, que em plantas, marcadores de organelas de herança materna (cpDNA ou mtDNA), dispersos unicamente por sementes, sofrem mais introgressão, apresentando menor valor taxonômico que os marcadores nucleares.

Padrões biogeográficos, distribuição e conservação

As análises filogeográficas de *A. caudata* não mostraram a formação de grupos distintos, apesar da população CPERJ apresentar um haplótipo (H38) não compartilhado com nenhuma outra população (Figura 1 e Tabela 4). Esta população deve ser analisada com cautela, pois apesar de existirem alguns registros em herbário da ocorrência da espécie no estado do Rio de Janeiro, existem dúvidas entre os taxonomistas/especialistas da ocorrência da espécie no Estado. Esta é uma situação controversa, pois muitos pesquisadores relataram que a espécie teria como limite norte de distribuição a região de Guarujá, São Paulo (Louzada R; Leme E, - comunicação pessoal). As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas de indivíduos cultivados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, provenientes de coletas realizadas em Petrópolis. Como ocorrem várias outras espécies do gênero *Aechmea* no Rio de Janeiro e considerando o fato dos indivíduos amostrados não estarem em período de floração, não se

descarta a possibilidade de ter sido coletada erroneamente outra espécie existente na região. Nas expedições de coleta realizadas por nosso grupo, para esta região e outras do estado, não houve sucesso em encontrar *A. caudata*.

Levando em consideração os 41 haplótipos encontrados, as populações mais diversas foram a CFLSC e CGJSP, porém as duas apresentam uma composição haplotípica bem distinta. Enquanto na primeira encontramos o haplótipo mais frequente bem representado (oito indivíduos com o H29), além de quatro haplótipos únicos, na CGJSP ocorrem sete haplótipos únicos além do haplótipo mais freqüente (H29) e o H5 compartilhado somente com populações de *A. winkleri*. Estas duas populações mais diversas para *A. caudata* estão localizadas em ilhas (Florianópolis e Guarujá, respectivamente), o que não é corroborado por Palma-Silva *et al.* (2009), que encontraram as populações menos diversas de *V. gigantea* em ilhas. Uma das populações mais diversas, a CGJSP, encontrada no presente estudo, pode ser considerada como ocorrendo em uma região (São Paulo) já mencionada como possível refúgio em outros estudos. Palma-Silva *et al.* (2009) citaram como um dos possíveis refúgios para a espécie *V. gigantea* as populações do estado de São Paulo e Rio de Janeiro. Estudos realizados com a espécie *Bradyous variegatus* (Barros *et al.*, 2006) e com espécies de sapos (Carnaval *et al.*, 2009), também citam regiões no estado de São Paulo como prováveis áreas de refúgio durante o último período glacial. Porém, populações tão ao Sul quanto Florianópolis, nos estudos realizados até o momento, não foram citadas como áreas de refúgios. Estudos palinológicos realizados no estado de Santa Catarina indicam que regiões costeiras não eram dominadas por campos durante o Pleistoceno, como nas partes mais elevadas (por exemplo, Serra do Rio do Rastro), sendo a costa dominada por Mirtáceas, que durante o Holoceno foram substituídas por taxa tropicais (Behling, 1995). Ainda, eventos de regressão e transgressão marinha a partir do Pleistoceno (Caruso *et al.*, 2000), podem ter permitido um maior contato entre o continente e a ilha de Florianópolis, facilitando a migração de várias espécies. Mais estudos se fazem necessários nesta área para tentar elucidar o padrão evolutivo que ocorreu mais ao Sul da Mata Atlântica. Como citado por Carnaval *et al.* (2009), não é possível afirmar que a região Sul carecia de áreas de refúgio durante o Pleistoceno. A existência de espécies e gêneros endêmicos e de algumas evidências paleoecológicas e genéticas evidenciam o contrário (Ledru *et al.*, 2007). Além disso, as diferenças nos padrões

de dispersão de sementes (que carregam o genoma plastidial) entre *V. gigantea* (vento – limitado) e sementes de *Aechmea* (animal – maiores distâncias) podem estar governando as diferenças nos padrões discrepantes de diversidade de cpDNA encontrados em ilhas continentais.

As populações de *A. winkleri* mostraram altos níveis de diversidade, superiores a muitas populações de *A. caudata*, apesar de sua distribuição geográfica restrita. Foram encontrados nove haplótipos na WUNRS, sendo dois exclusivos dessa população; oito na WPGRS, dos quais três exclusivos, e seis haplótipos em cada uma das demais populações avaliadas (WBURS e WPPRS). Além disso, a espécie também apresentou altos índices de diversidade genética para marcadores nucleares (dados apresentados no capítulo 4). Por ser uma espécie de distribuição geográfica restrita, ocorrendo em uma região muito pequena (as maiores populações em uma área de 465 hectares) estes altos índices de diversidade são incomuns (Gitzendanner e Soltis, 2000). *Aechmea winkleri* é encontrada na região central do Rio Grande do Sul, mais precisamente no município de Santa Cruz do Sul e arredores. O município de Santa Cruz do Sul é contornado a leste e brevemente a norte por morros areníticos em forma de tabuleiro cujo topo apresenta uma fina camada de basalto, sendo uma continuidade com a Serra Geral (Rambo, 1994; Collischonn, 2001). É nesta área de morros, na zona urbana de Santa Cruz do Sul, denominada Cinturão Verde, que encontramos as maiores populações de *A. winkleri*. Conforme Decreto nº 4117 de 1994, o Cinturão Verde é uma área de 465 hectares de vegetação secundária, com perímetro linear de 32 km (Alves e Collischonn, 2001). A região central do estado do Rio Grande do Sul (Depressão Central) é reconhecida pela grande quantidade de endemismos (Rambo, 1994), onde de 1288 fanerógamas, 164 espécies são endêmicas da região, parcialmente de origem brasileira, parcialmente de origem andina. Áreas que apresentam grandes endemismos podem ser consideradas como áreas que permaneceram como refúgios durante a última glaciação (por exemplo, Carnaval *et al.*, 2009). Estudos palinológicos indicam como possíveis refúgios para o Sul do Brasil, vales profundos e protegidos dos campos de altitude ou as encostas da Serra Geral ou ainda na vegetação das terras planas da costa (Behling e Pillar, 2007; Stefenon *et al.*, 2008). Como o Cinturão Verde é uma área de encosta da Serra Geral, uma hipótese a ser investigada é a desta área como um possível refúgio durante a última glaciação. A região é pouco estudada, sendo estes resultados

aqui apresentados os primeiros envolvendo este tipo de abordagem para a área. Estudos realizados até o momento indicam a ocorrência no local de 189 espécies arbóreas, 30% das já registradas para o estado, 69 espécies de líquens, 45 de mamíferos, 29 de anfíbios, sendo uma delas nova (Putzke e Köhler, dados não publicados). Os resultados encontrados para espécies de Gimnosperma do gênero *Podocarpus* (Ledru *et al.*, 2007) indicam três regiões como prováveis refúgios, uma delas compreendida entre 23° e 30° S, o que corrobora a região de encosta da Serra Geral como possível refúgio. Porém, mais estudos são necessários para a completa compreensão deste padrão.

Estudos filogeográficos são extremamente importantes para o conhecimento dos processos que levaram a Mata Atlântica a ser considerada um dos oito maiores “hotspots” de biodiversidade (Myers *et al.*, 2000). Porém, este tipo de estudo ainda é muito escasso, principalmente para plantas (Salgueiro *et al.*, 2004; Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Ledru *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009). Além disso, estes estudos são de extrema importância também para estabelecer estratégias de conservação e manejo. *Aechmea caudata* é uma espécie amplamente distribuída, porém apresenta populações muito pequenas. Os colaboradores do nosso grupo de pesquisa acreditam que a espécie não ocorra (ou já tenha sido extinta) no estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo, já que a distribuição geográfica descrita por Smith e Downs (1979) prevê a espécie ocorrendo nestes estados. Além disso, muitas populações não foram mais encontradas, conforme registros nos herbários visitados. *Aechmea winkleri* é uma espécie de distribuição geográfica extremamente restrita, e está na lista de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA: www.ibama.gov.br), entretanto, apresenta altos índices de diversidade. Porém, a área onde ela ocorre está sendo drasticamente reduzida, principalmente pela construção civil, sendo que planos de conservação são urgentes. A partir dos dados aqui encontrados, sugerimos que as populações mais diversas de cada uma das espécies sejam prioridade nos planos de conservação. Além disso, como ambas são espécies alógamas (Büttow, em preparação), o maior número possível de populações devem ser incluídas em áreas de preservação.

Tabela 1. Populações de *Aechmea caudata* e *A. winkleri* amostradas neste estudo. ID = nome da população.

ID	Estado	Localidade	Ambiente	Latitude S	Longitude W
CPERJ*	RJ	Petrópolis	Cultivada	22°27'	43°17'
CPGSP	SP	Praia Grande	Restinga	24°01'	46°23'
CGJSP	SP	Guarujá	Restinga	23°59'	46°11'
CSGPR	PR	Serra da Graciosa	Mata de encosta	25°20'	48°54'
CMAPR	PR	Matinhos	Restinga	25°48'	48°32'
CGUPR	PR	Guaratuba	Mata fechada	25°56'	48°48'
CILSC	SC	Ilhota	Mata fechada preservada	26°48'	48°55'
CFLSC	SC	Florianópolis	Mata secundária	27°31'	48°30'
CSRSC	SC	Serra do Rio do Rastro	Mata de encosta	28°23'	49°31'
WPGRS	RS	Parque da Gruta - Sta. Cruz Sul	Mata fechada preservada	29°42'	52°24'
WUNRS	RS	União - Sta. Cruz Sul	Mata secundária	29°41'	52°25'
WBURS	RS	Bairro Universitário - Sta. Cruz Sul	Mata secundária	29°41'	52°26'
WPPRS	RS	Pinus Parque - Sta. Cruz Sul	Mata secundária	29°40'	52°25'

* A primeira letra de cada sigla corresponde à espécie (C = *A. caudata*; W = *A. winkleri*). As duas últimas letras da sigla correspondem ao Estado de origem da população (RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; PR = Paraná; SP = São Paulo e RJ = Rio de Janeiro).

Tabela 2. Características morfológicas quantitativas avaliadas em uma população de *Aechmea caudata* e em três populações de *A. winkleri*. Dados apresentados como média ± erro padrão.

Características	Populações			
	CFLSC (18)*	WUNRS (20)*	WBURS (20)*	WPPRS (20)*
1 - Número de ramificações na inflorescência	1,00 ± 0,333 ^b	12,90 ± 0,680 ^a	13,00 ± 1,003 ^a	12,30 ± 0,912 ^a
2 - Comprimento da flor (mm)	22,20 ± 0,693 ^a	20,34 ± 0,360 ^b	21,34 ± 0,340 ^{ab}	21,29 ± 0,298 ^{ab}
3 - Comprimento da raque (cm)	20,83 ± 0,892 ^a	12,42 ± 0,522 ^c	15,12 ± 0,698 ^b	12,98 ± 0,667 ^{bc}
4 - Largura inferior da inflorescência (cm)	6,34 ± 0,630 ^{ab}	6,26 ± 0,245 ^b	7,76 ± 0,218 ^a	6,78 ± 0,346 ^{ab}
5 - Altura do primeiro nó da inflorescência (cm)	16,39 ± 1,172 ^a	7,42 ± 0,574 ^c	11,80 ± 0,823 ^b	8,72 ± 0,649 ^c
6 - Comprimento do escapo (cm)	60,93 ± 1,919 ^a	31,48 ± 0,936 ^c	36,70 ± 1,241 ^b	34,15 ± 1,458 ^{bc}
7 - Comprimento da 3ª folha (cm)	72,76 ± 5,006 ^a	48,88 ± 2,062 ^b	56,21 ± 2,104 ^b	54,25 ± 2,091 ^b
8 - Largura da 3ª folha (cm)	6,80 ± 0,328 ^a	3,74 ± 0,103 ^b	3,98 ± 0,096 ^b	3,97 ± 0,101 ^b
9 - Número de flores	263,83 ± 20,951 ^a	102,50 ± 7,484 ^b	113,15 ± 10,028 ^b	112,95 ± 10,300 ^b
10 - Área da inflorescência (cm ²)	13,87 ± 1,295 ^{ab}	12,76 ± 0,571 ^b	16,53 ± 0,510 ^a	14,46 ± 0,789 ^{ab}
11 - Relação comprimento/ largura da folha (cm)	11,08 ± 0,977 ^b	13,38 ± 0,809 ^{ab}	14,28 ± 0,619 ^a	13,88 ± 0,720 ^{ab}
12 - Densidade da inflorescência	0,08 ± 0,004 ^b	0,13 ± 0,006 ^a	0,15 ± 0,010 ^a	0,13 ± 0,008 ^a
13 - Comprimento da sépala (mm)	16,06 ± 0,549 ^a	13,64 ± 0,324 ^b	14,82 ± 0,243 ^{ab}	14,39 ± 0,225 ^b
14 - Comprimento da pétala (mm)	12,11 ± 0,413	11,51 ± 0,170	12,18 ± 0,167	11,48 ± 0,147
15 - Largura da pétala (mm)	4,54 ± 0,217 ^a	4,01 ± 0,066 ^b	4,37 ± 0,064 ^{ab}	4,40 ± 0,083 ^{ab}
16 - Comprimento da bráctea floral (mm)	13,52 ± 1,057 ^a	6,43 ± 0,337 ^b	7,62 ± 0,250 ^b	7,52 ± 0,338 ^b
17 - Largura da bráctea floral (mm)	3,90 ± 0,210 ^a	2,73 ± 0,068 ^b	2,84 ± 0,113 ^b	2,73 ± 0,065 ^b
18 - Largura da base da flor (mm)	3,89 ± 0,139 ^a	2,38 ± 0,055 ^b	2,66 ± 0,067 ^b	2,54 ± 0,053 ^b
19 - Comprimento do estilete (mm)	11,48 ± 0,279 ^{ab}	10,07 ± 0,141 ^c	11,66 ± 0,364 ^a	10,65 ± 0,148 ^{bc}
20 - Comprimento do estame (mm)	10,96 ± 0,438 ^a	9,96 ± 0,153 ^b	10,50 ± 0,204 ^{ab}	10,22 ± 0,113 ^{ab}
21 - Comprimento da antera (mm)	5,67 ± 0,147 ^a	4,16 ± 0,089 ^b	4,24 ± 0,100 ^b	4,26 ± 0,084 ^b
22 - Comprimento do filete (mm)	8,30 ± 0,419	8,16 ± 0,152	8,20 ± 0,277	7,85 ± 0,144

* Número de indivíduos amostrados.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias segundo teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 3. Diversidade genética de nove populações de *Aechmea caudata* e quatro populações de *A. winkleri* para quatro locos de microssatélites plastidiais. N = tamanho da amostra; H_E = diversidade gênica.

População	N	Nº de haplótipos	H_E (desvio padrão)	Riqueza alélica
CPERJ	3	2	0,667 (0,314)	1,000
CPGSP	5	3	0,700 (0,218)	1,200
CGJSP	12	12	1,000 (0,034)	2,000
CSGPR	7	5	0,905 (0,103)	1,714
CMAPR	6	4	0,867 (0,129)	1,600
CGUPR	6	5	0,933 (0,122)	1,800
CILSC	10	8	0,956(0,059)	1,867
CFLSC	27	14	0,987 (0,045)	1,712
CSRSC	10	8	0,956 (0,059)	1,867
WPGRS	15	8	0,790 (0,105)	1,448
WUNRS	15	9	0,905 (0,054)	1,725
WBURS	15	6	0,810 (0,078)	1,475
WPPRS	14	6	0,835 (0,070)	1,536

Tabela 4. Frequências de haplótipos de cpDNA em 13 populações analisadas neste estudo. (N) = número de indivíduos amostrados por população.

Populações Haplótipos	CPERJ (3)	CPGSP (5)	SGJSP (12)	CSGPR (7)	CMAPR (6)	CGUPR (6)	CILSC (10)	CFLSC (27)	CSRSC (10)	WPGRS (15)	WUNRS (15)	WBURS (15)	WPPRS (14)
H1*						1							
H2*			1										
H3*								1					
H4*			1										
H5			1								1		
H6								2		1			
H7							1	1		2	4	6	2
H8								1				2	5
H9*				1									
H10							1		2				
H11							1	2	1		3	2	3
H12*								1					
H13							1				1		
H14									1		1	1	
H15*								1					
H16											1	1	
H17*											1		
H18*										1			
H19*			1										
H20*								1					
H21*										1			
H22*										1			
H23			1			2		1		7	2		2
H24				1				1		1			1
H25								1				1	
H26*											1		
H27*			1										

Tabela 4. Continuação

Populações Haplótipos	CPERJ (3)	CPGSP (5)	SGJSP (12)	CSGPR (7)	CMAPR (6)	CGUPR (6)	CILSC (10)	CFLSC (27)	CSRSC (10)	WPGRS (15)	WUNRS (15)	WBURS (15)	WPPRS (14)
H28		1	1			1		3					
H29		3	1				1	8	1				
H30*			1										
H31						1	2	1	1	1			
H32					2								
H33*				1									
H34			1	1	1		1		2				1
H35							2		1				
H36	2												
H37	1				1				1				
H38				2	1	1							
H39*		1											
H40*			1										
H41*			1										

* Haplótipos únicos.

Tabela 5. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para *Aechmea caudata* e *A. winkleri*.

Fonte	GL	SQ	Varição (%)	F ₋ statistic
Entre espécies	1	10,527	10	F _{RT} = 0,102****
Entre populações/ dentro de espécies	11	24,542	12	F _{SR} = 0,134****
Dentro populações	132	111,765	78	F _{ST} = 0,223****

A significância de cada estatística F foi testada através de 9999 permutações. **** $P < 0,001$.

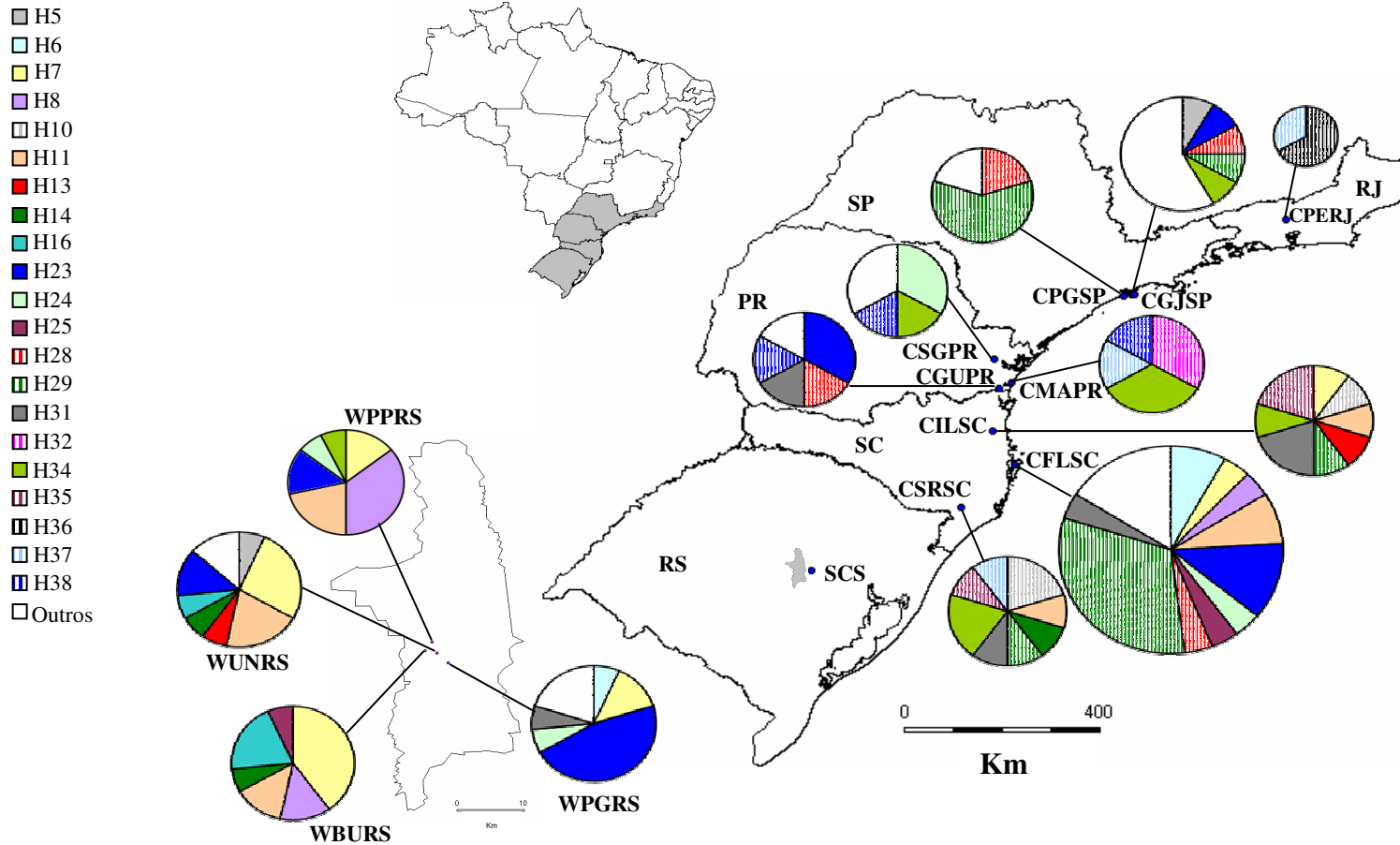


Figura 1. Distribuição dos haplótipos com frequência maior que um entre as populações de *Aechmea caudata* e *A. winkleri*. O tamanho de cada círculo é proporcional ao tamanho da amostra. As cores representam diferentes haplótipos, como mostrado na chave. Outros: haplótipos únicos.

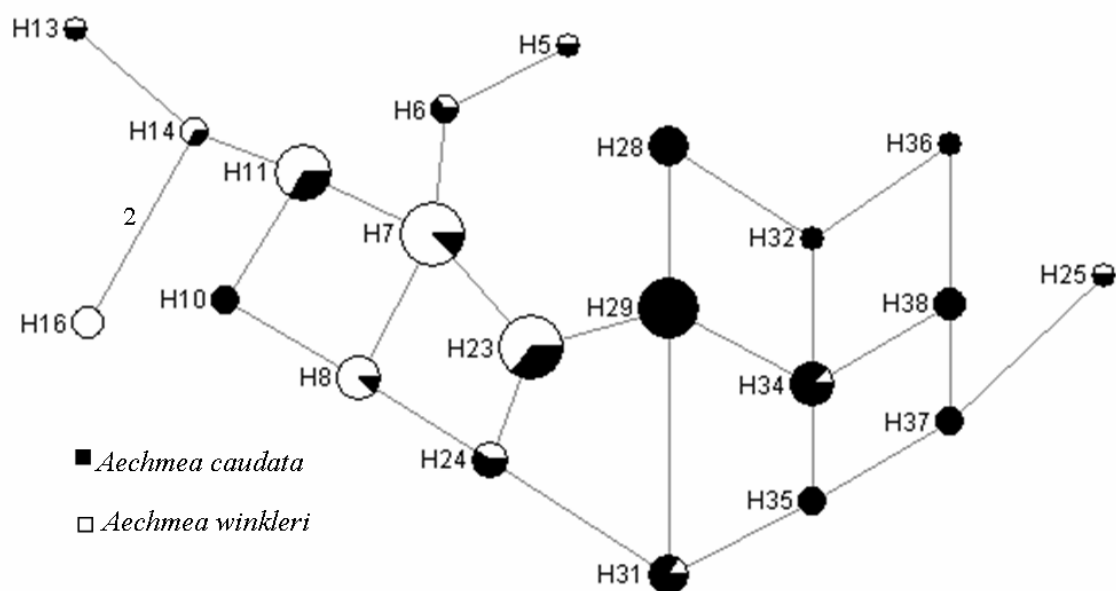


Figura 2. Análise de “Median-joining” da relação entre haplótipos de cpDNA com frequência maior que um de 86 indivíduos de *Aechmea caudata* e 59 indivíduos de *A. winkleri* baseado em quatro locos de microssatélites plastidiais. O tamanho de cada círculo é proporcional a frequência observada de cada haplótipo. O número de passos mutacionais maiores que um estão marcados com números nas linhas entre os haplótipos.

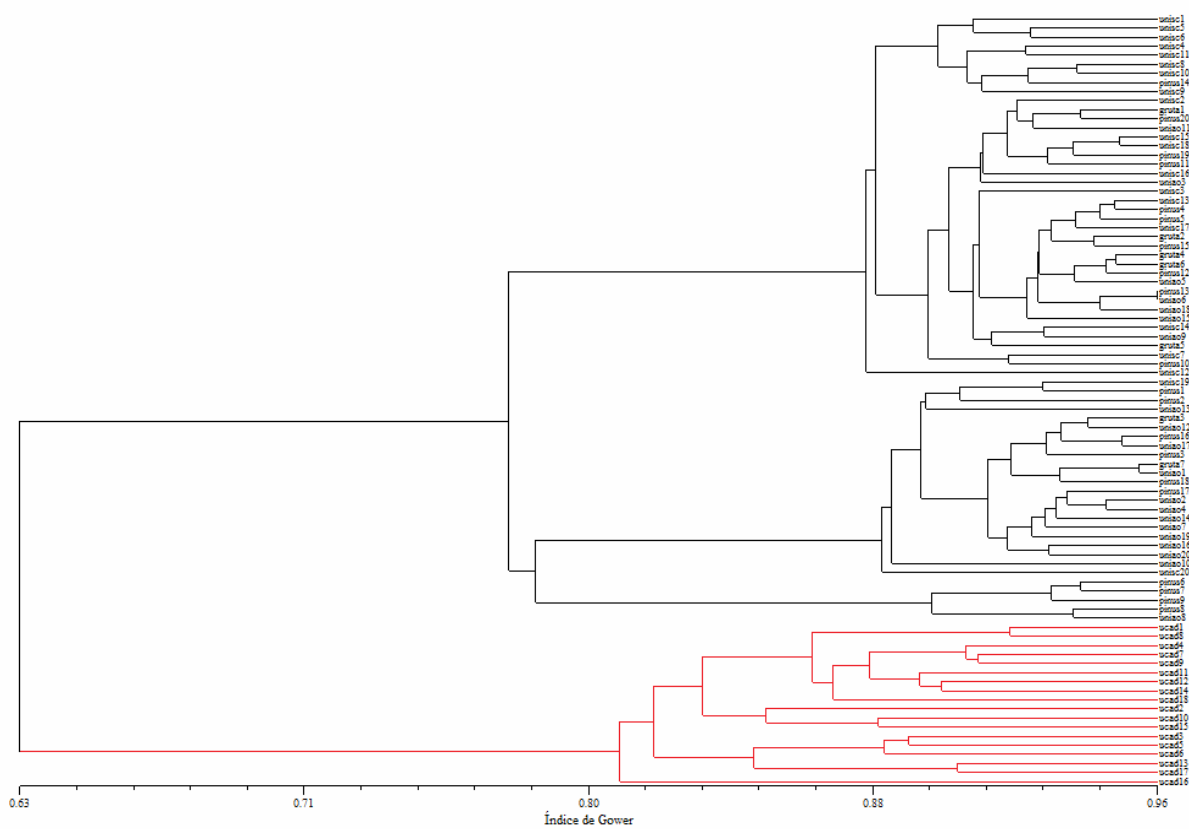


Figura 3. Dendrograma obtido a partir do índice de Gower, baseado em 22 caracteres morfológicos quantitativos e quatro caracteres morfológicos qualitativos para 18 indivíduos de *Aechmea caudata* e para 67 indivíduos de *A. winkleri*. Em vermelho: clado com os indivíduos de *A. caudata*.



Figura 4. A) Detalhe da cor da sépala da flor em *Aechmea caudata*; B) Detalhe da cor da sépala da flor de *Aechmea winkleri*.

Capítulo 3

Isolamento de locos de microssatélites de *Aechmea winkleri* Reitz (Bromeliaceae), uma espécie endêmica do Rio Grande do Sul

Os marcadores de microssatélites ou SSR (“simple sequence repeats”) possuem características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações (Powell *et al.*, 1996). Estas sequências são constituídas de DNA repetitivo, dispostas lado a lado, onde pequenos motivos (1 a 6 pares de base) são repetidos n vezes. Os microssatélites representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais, geralmente adições ou deleções de um número integral de repetições, com taxa muito mais elevada do que taxas observadas em sequências de DNA não repetitivo (Jarne e Lagoda, 1996). Estão distribuídos ao longo de sequências codificantes e não codificantes do DNA (Schlötterer e Tautz, 1992). Estas regiões repetitivas têm sido identificadas nos genomas de procariotos e eucariotos nos três genomas: núcleo e cloroplasto (Powell *et al.*, 1996) e mitocôndria (Soranzo *et al.*, 1999).

Bibliotecas de microssatélites na família Bromeliaceae já foram desenvolvidas e caracterizadas para todas as subfamílias, Tillandsioideae (Boneh *et al.*, 2003; Palma-Silva *et al.*, 2007), Pitcairnoideae (Sarhou *et al.*, 2003; Paggi *et al.*, 2008) e mais recentemente para Bromelioideae (Zanella, 2009). Apesar de os microssatélites apresentarem como uma importante limitação a amplificação espécie-específica, estudos têm demonstrado que ocorre amplificação heteróloga entre espécies próximas (Barbará *et al.*, 2007/ b). Entretanto, testes de amplificação heteróloga realizados com a espécie *Aechmea winkleri*, mostraram um aproveitamento muito baixo, sendo que somente três, dos 37 locos isolados até o momento, mostraram um padrão claro e polimórfico (discutido no capítulo 4).

Sendo assim, uma biblioteca de microssatélites para *A. winkleri* foi desenvolvida no Laboratório de Análise Genética e Molecular (CGMEG), na Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil, na disciplina “Construção de bancos enriquecidos de microssatélites em eucariotos: um curso prático e teórico”, oferecida pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular daquela Universidade.

O DNA genômico de *A. winkleri* foi extraído de folhas seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990). O isolamento dos marcadores envolveu a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com repetições (CT) n e (GT) n biotinizadas e ligadas a esferas magnéticas como descrito por Kijas *et al.* (1994) com modificações de Billote *et al.* (1999). Os fragmentos de microssatélites selecionados foram ligados ao vetor pGEM-T “Easy” (Promega) e usados para transformar células competentes XL-1 “Blue” (*Escherichia coli*). As colônias

transformadas foram cultivadas em meio contendo ampicilina e X-galactosidase. Um total de 96 colônias recombinantes foram obtidas e 48 foram sequenciadas utilizando o kit de sequenciamento BigDye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems) no sequenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Somente nove clones apresentaram motivos de SSR e as sequências “forward” e “reverse” foram alinhadas no programa SEQUENCHER versão 4.1.2 (Gene Codes) e os nove pares de “primers” foram desenhados utilizando o programa PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Tabela 1).

Para cada microsatélite, o “primer forward” foi sintetizado com uma cauda M13 de 19 pares de bases (bp) (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador TC – 412 (Techne), com 20 indivíduos (cinco de cada população), e a reação final apresentou 10 ng de DNA genômico, 1X de tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada primer (“forward” e “reverse”) e 0,5 unidade de DNA taq polimerase (LGC Biotecnologia), com um volume final de 10 µl. O protocolo de amplificação inicialmente utilizado foi o descrito por Palma-Silva *et al.* (2007), através de programa do tipo “touchdown”. Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (conforme metodologia descrita no capítulo 4).

Os primeiros resultados obtidos, com as condições acima descritas, não foram satisfatórios, nenhum marcador amplificou fragmentos do tamanho esperado. Posteriormente foi alterada a concentração final de MgCl₂, passando de 1,5 mM para 1,0 e 2,0 mM, mas sem resultados satisfatórios novamente. Após foi alterada a quantidade de marcador (para 15 pmol), de DNA taq polimerase (para 1 unidade) e a concentração de DNA genômico (20 e 30 ng). Porém, novamente sem sucesso. Como alternativa, foi utilizada a DNA taq polimerase Platinum (Invitrogen), mas não houve sucesso nas ampliações. Todos os reagentes da reação foram testados e outras amostras de DNA também foram utilizadas, mas sem resultados. A partir disso, foi alterada a temperatura de anelamento dos “primers”, utilizando àquela fornecida pela programa PRIMER3. Com esta alteração foi obtida a amplificação do loco Aw04, porém, em 40 indivíduos testados ele mostrou um padrão monomórfico. Para os demais locos, não foram obtidos resultados satisfatórios, com exceção dos locos Aw06 e Aw08 que amplificaram satisfatoriamente em somente 20 indivíduos. Quando mais indivíduos foram incluídos nas análises, os mesmos não funcionaram, e este padrão se manteve, inclusive

trocando-se os indivíduos testados. Para alguns indivíduos o padrão de amplificação foi considerado satisfatório, com três alelos por loco inclusive, mas para a maioria, não foram observadas bandas no gel. Este padrão foi aleatório, não estando ligado a indivíduos de uma população específica, por exemplo. Foram testados então concentrações ainda mais elevadas de $MgCl_2$ (3,0 e 3,5 mM) e foram adicionados às reações de PCR, DMSO ou BSA (1 μ l em um volume final de 10 μ l), ainda sem sucesso. Então, como última alternativa, a genotipagem de cinco indivíduos para cada loco foi realizada em sequenciador automático (ABI 3700 Applied Biosystems), porém, outra vez, não ocorreu amplificação de fragmentos de tamanho esperado para nenhum loco.

Os microssatélites têm sido isolados e caracterizados em inúmeras espécies de plantas e animais (Tautz, 1989; Wang *et al.*, 1994). Estas sequências são altamente polimórficas e espécie-específicas, sendo que as regiões contendo os SSRs são amplificadas por PCR, o que tem difundido a sua utilização (Edwards *et al.*, 1996). Existem diferentes técnicas para o isolamento de SSRs (Karagyozov *et al.*, 1993; Armour *et al.*, 1994; Kijas *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Cifarelli *et al.*, 1995) e revistas específicas para a sua publicação (Molecular Ecology Resources, Animal Genetics e Conservation Genetics), as quais promovem o desenvolvimento e utilização ainda maior destes marcadores.

O nosso grupo de pesquisa isolou e caracterizou 25 dos 37 locos de microssatélites já descritos para a família Bromeliaceae (Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008; Zanella, 2009). A metodologia utilizada na construção da biblioteca de *A. winkleri* foi a mesma utilizada nos dois últimos trabalhos citados acima. Embora tenha sido observada uma baixa eficiência no enriquecimento da biblioteca de *Bromelia antiacantha* (Zanella, 2009), dois locos mostraram-se polimórficos e foram utilizados no estudo da diversidade e estruturação genética da espécie. Para a biblioteca de *A. winkleri* foi observado o mesmo problema, com baixo número de clones com sequência de SSR. Os desenhos realizados para os “primers” foram revisados, e não foi encontrado nenhum problema aparente. Estudos deverão ser realizados para tentar entender o que pode ter ocorrido principalmente no que diz respeito ao fato de dois locos amplificarem em alguns indivíduos e na maioria não. Uma hipótese para isso, é que mutações nas regiões de desenho dos “primers” para estes indivíduos tenham ocorrido, não permitindo o anelamento dos “primers”. Porém o número de indivíduos que

apresentaram este problema é grande. De qualquer forma, o nosso grupo de pesquisa está aguardando o sequenciamento dos 48 clones restantes para tentar novamente validar uma biblioteca de microssatélites para *A. winkleri*.

Tabela 1. Características dos locos de microssatélites de *Aechmea winkleri*, incluindo o nome do loco, sequência do primer, motivo da repetição, tamanho esperado e temperatura de anelamento.

Loco	Sequência do primer	Motivo da repetição	Tamanho esperado	Temperatura de anelamento
Aw01	F: AGGCACTGCACTAGGGTCTGA R: AATTTAACACTCTCGGGTCTC	(CA) ₉ (CT) ₅ (GAA) ₇	246 bp	50°C
Aw02	F: AGTTTTTCCAGTTGCTCTAC R: GTAGGTTTTCTTCCTCCTTT	(AG) ₁₈	210 bp	52°C
Aw03	F: CTGTCACTTTCCCCTATT R: ACAAGCAAGAAGGATTTA	(CA) ₁₄	143 bp	50°C
Aw04	F: GCAGCACATCAACAATTATC R: TAGGGTTAGGGTTAGGGTTT	(GA) ₁₄	183 bp	55°C
Aw05	F: ACCACTCTTTACTTTGTGA R: GTGTGAGTTTAATTGGTGTA	(CT) ₁₅	176bp	50°C
Aw06	F: CCGGTTTTTGTGATTTGGTT R: CCCGCTTCGTTTATTCATT	(CT) ₁₁	282 bp	52°C
Aw07	F: CGTTGCAATTTAACACTCTC R: GTATCAGATTCGGAGAACAG	(GA) ₁₃ GG(GA) ₁₁	188 bp	59°C
Aw08	F: CTCGTGTGAAGATAGAGTTT R: ATAGTTAGGTTTGGCTCTTC	(TA) ₄ (GA) ₁₃	231 bp	50°C
Aw09	F: CCAAATTAGTAGCGGTCTCCA R: GCCTATATGCAACAAAAGT	(AG) ₁₆	145 bp	52°C

Capítulo 4

Variabilidade genética e morfológica em populações de *Aechmea winkleri* (Bromeliaceae): uma espécie endêmica e ameaçada da Mata Atlântica

4.1 Introdução

A família Bromeliaceae é uma das famílias de maior riqueza e diversidade da Mata Atlântica (para mais detalhes veja Martinelli *et al.*, 2008), com aproximadamente 3000 espécies (Luther, 2006). São plantas epífitas, saxícolas ou terrestres, ocorrendo em praticamente todos os ecossistemas neotropicais (Leme e Marigo, 1993).

O extrativismo ilegal, decorrente principalmente do interesse no potencial ornamental das bromélias (Andrade e Demattê, 1999; Coffani-Nunes, 2002), e a destruição e fragmentação do seu habitat, a Mata Atlântica, um dos “hotspots” de biodiversidade mais importantes e vulneráveis do mundo (Myers *et al.*, 2000) são as principais ameaças às espécies da família Bromeliaceae.

Estudos de genética da conservação para espécies ameaçadas são necessários para estabelecer planos de manejo para a preservação da biodiversidade. Estimativas dos níveis de diversidade genética e sua distribuição entre indivíduos e populações são de extrema importância para qualquer estudo evolutivo, de conservação e manejo de plantas. A estrutura genética das populações reflete a interação entre diferentes processos, incluindo a história evolutiva da espécie (distribuição, fragmentação do habitat, isolamento da população), mutação, deriva genética, sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção (Sales *et al.*, 2001). Populações com distribuição geográfica restrita e baixos índices de variabilidade genética têm probabilidade reduzida de adaptação quando ocorrem alterações no ambiente, podendo levar à extinção da espécie (Fischer e Matthies, 1998). Além disso, para espécies ameaçadas, a identificação de genótipos únicos é um importante passo para definir unidades de conservação e de importância evolutiva (Qamaruz-Zaman *et al.*, 1998).

Estudos de genética de populações estão disponíveis para poucas espécies de bromélias, por exemplo, para o gênero *Tillandsia* (Soltis *et al.*, 1987; González-Astorga *et al.*, 2004), *Aechmea* (Murawski e Hamrick, 1990; Izquierdo e Piñero, 2000; Almeida, 2006), *Pitcairnia* (Sarhou *et al.*, 2001), *Puya* (Sgorbati *et al.*, 2004), *Encholirium* (Cavallari *et al.*, 2006), *Alcantarea* (Barbará *et al.*, 2007/ a; 2008; 2009), *Vriesea* (Alves *et al.*, 2004; Palma-Silva *et al.*, 2009) e *Bromelia* (Zanella, 2009).

Aechmea winkleri Reitz é uma espécie preferencialmente saxícola, podendo ser considerada endêmica da região central do estado do Rio Grande do Sul e ameaçada de extinção (IBAMA: www.ibama.gov.br). A espécie apresenta folhas de 30 a 36 cm de comprimento, verdes, com margem serrilhada com espinhos de 0,5 mm de comprimento. Inflorescência bipinada na metade basal, simples para o ápice. Flores sésses de 16 mm de comprimento; sépalas vermelhas, fortemente assimétricas; pétalas amarelas. Ovário subcilíndrico vermelho com 5 mm de comprimento (Smith e Downs, 1979). São conhecidas atualmente sete populações de *A. winkleri*, sendo vários aspectos como sistema de cruzamento, fenologia e biologia da polinização ainda desconhecidos para a espécie.

O objetivo do presente trabalho foi estimar a diversidade e estrutura genética de populações de *A. winkleri* ao longo de sua distribuição geográfica atualmente conhecida, utilizando marcadores moleculares microssatélites nucleares. Foi caracterizada também a variação morfológica encontrada na espécie. A partir dos resultados obtidos foram sugeridos planos de conservação.

4.2 Materiais e métodos

Populações amostradas e extração de DNA

Para este estudo foram conduzidas coletas a campo entre março de 2008 e abril de 2009. Sete populações de *Aechmea winkleri* foram identificadas e mapeadas, e em quatro delas foram realizadas as coletas, pelo fácil acesso às plantas e por serem as maiores populações. Foram amostrados 142 indivíduos ao longo de toda a sua distribuição geográfica, no município de Santa Cruz do Sul, região central do estado do Rio Grande do Sul, único local atualmente conhecido de ocorrência da espécie (Tabela 1; Figura 1). A distância geográfica entre as populações amostradas variou de 1,34 a 4,22 km. Para evitar a coleta de clones, já que a espécie apresenta alta reprodução clonal, manteve-se uma distância mínima de 1 metro entre os indivíduos amostrados.

Folhas jovens de cada indivíduo foram coletadas e estocadas em nitrogênio líquido até a extração de DNA. O DNA genômico total foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle e

Doyle (1990). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10mg/ml), utilizando marcador de peso molecular conhecido como referência.

Marcadores moleculares e genotipagem

Foram testados 37 marcadores moleculares nucleares tipo microsatélites descritos para diferentes espécies de bromélias (Boneh *et al.*, 2003; Sarthou *et al.*, 2003; Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008; Zanella, 2009). Após os testes, três marcadores apresentam um padrão polimórfico de amplificação: VgC01 descrito para *Vriesea gigantea* (Palma-Silva *et al.*, 2007), PaA10 e PaC05 descritos para *Pitcairnia albiflos* (Paggi *et al.*, 2008). As amplificações por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador TC – 412 (Techne) com: 10 ng de DNA genômico (para o marcador PaC05, 20 ng de DNA genômico para os demais marcadores), 1X de tampão da enzima, 1 mM de MgCl₂ (para o marcador PaA10, 1,5 mM de MgCl₂ para o VgC01 e 2 mM de MgCl₂ para o PaC05), 0,2 mM de dNTP, 10 pmol de cada marcador (“forward” e “reverse”) (para os marcadores PaA10 e PaC05 e 15 pmol para o VgC01) e 0,5 unidade de Taq polimerase (LGC Biotecnologia) (para os marcadores VgC01 e PaA10 e 1 unidade para o PaC05), com um volume final de 10 µl. O protocolo de amplificação utilizado está descrito em Palma-Silva *et al.* (2007). Os produtos obtidos foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% (19:1 acrilamida-bisacrilamida) contendo 42,5% de uréia e 20% de tampão TBE 5X. A 60 ml dessa solução foi acrescentado 600 µl de APS (persulfato de amônia a 10%) e 60 µl de TEMED. O pré-tratamento das placas foi realizado com etanol 95% e acetona para limpeza. Em uma das placas foi aplicado 400 µl Repel Silane e na outra uma solução contendo 1,7 µl BindSilane, 5 µl de ácido acético e 995 µl de etanol 95%. O gel foi pré-migrado a 1300 V por aproximadamente 40 minutos em 0,5X de tampão TBE antes da aplicação dos produtos obtidos por PCR, aos quais foram adicionados 5 µl de “stop solution” (0,2 ml de NaOH 5M, 95 ml de formamida, 50 mg de bromofenol “blue”, 50 mg de xileno “cyanol” FF). As amostras foram desnaturadas em termociclador a 95°C por três minutos e imediatamente colocadas no gelo. Seis µl de cada amostra foram aplicadas no gel, o qual migrou a 1300 V

por aproximadamente 90 minutos. Para a detecção das bandas o gel foi corado com nitrato de prata 1X.

O protocolo de coloração seguido foi: ácido nítrico 1% por quatro minutos, lavagem com água destilada, nitrato de prata 1X por 20 minutos, duas lavagens com água destilada, solução reveladora (29,6 g de carbonato de cálcio, 1000 ml de água destilada, 540 µl de formol e 250 µl de tiosulfato de sódio 10ng/ml) até o aparecimento das bandas, duas lavagens com água destilada, ácido acético 10% por quatro minutos, lavagem com água destilada, todas as etapas sob agitação constante. Os produtos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular de 50 pb.

Análise estatística

Para caracterizar os locos de microssatélites nas populações de *A. winkleri* foram estimados: a) A - número de alelos por locos; b) H_O - heterozigosidade observada; c) H_E - heterozigosidade esperada; d) F_{IT} coeficiente total de endogamia; e) F_{IS} - coeficiente de endocruzamento. Estes parâmetros foram estimados através dos programas Microsatellite Analyser (Dieringer e Schlötterer, 2003) e FSTAT 1.2 (Goudet, 1995). Cada loco foi testado para desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o programa FSTAT.

Os níveis de diversidade genética dentro das populações foram descritos calculando os seguintes parâmetros: a) R_S - riqueza alélica (El Mousadik e Petit, 1996); b) H_O - heterozigosidade observada; c) H_E - heterozigosidade esperada; d) F_{IS} - coeficiente de endocruzamento (Weir e Cockerham, 1984). Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram identificados utilizando testes exatos no Genepop (Raymond e Rousset, 1995).

Uma análise Bayesiana foi realizada para estimar o número de grupos genéticos (K) e proporção de mistura (Q) para cada indivíduo através do programa STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000). A análise foi realizada sob o modelo de mistura assumindo frequências alélicas independentes e utilizando um período de “burn-in” de 50.000, corridas de 300.000 comprimentos e 10 interações para cada K , que variou de um a sete, para confirmar a estabilização das estatísticas (Pritchard *et al.*, 2000).

A análise molecular da variância (AMOVA) foi realizada no programa GENALEX (Peakall e Smouse, 2006) para microssatélites nucleares e para os marcadores de cpDNA,

permitindo a distinção entre os efeitos da dispersão do pólen e da semente sobre os padrões de variabilidade genética. A significância de cada estatística F foi testada através de 9999 permutações no GENALEX. Para estimar a contribuição relativa do fluxo de pólen “versus” o por sementes sobre o fluxo gênico total, a fórmula abaixo foi aplicada (Ennos, 1994):

$$\text{Fluxo de pólen/ fluxo por sementes} = [(1/F_{ST(B)} - 1) - 2(1/F_{ST(M)} - 1)] / (1/F_{ST(M)} - 1)$$

onde $F_{ST(B)}$ e $F_{ST(M)}$ são níveis de diferenciação populacional calculados a partir de marcadores herdados de forma biparental (nuclear) e materna (cpDNA), respectivamente. O cálculo da razão do fluxo pólen-semente apresentado está baseado na suposição de que a herança materna de cpDNA é regra em *A. winkleri* como para a maioria das outras angiospermas (Ennos, 1999).

Valores de F_{ST} e fluxo gênico (Nm) par a par foram estimados para as populações de *A. winkleri* no programa GENALEX. O fluxo gênico foi estimado a partir dos valores de F_{ST} sob a suposição de equilíbrio entre migração e deriva.

Foram geradas matrizes de distância genética (Nei, 1972) entre as populações e a construção do dendrograma foi realizada através do método UPGMA. As matrizes e o dendrograma foram gerados no programa TFGPA 1.3 (Miller, 1997).

Análise morfológica

Vinte e duas características morfológicas quantitativas (Tabela 2) e quatro qualitativas foram avaliadas em todas as populações de *A. winkleri* (67 indivíduos). As características avaliadas foram selecionadas de acordo com Vervaeke *et al.* (2004) e Costa *et al.* (2009) conforme descrito em detalhes no capítulo 2.

Os dados quantitativos foram testados quanto a sua normalidade e submetidos a uma análise de variância (ANOVA). A significância das diferenças entre as médias foi testada através do teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas no programa SAS (versão 8, Instituto SAS, Cary, Carolina do Norte, USA). A população PG não foi incluída nas análises devido ao baixo tamanho da amostra ($N = 7$).

Para análise simultânea das características quantitativas e qualitativas foi calculado o índice de Gower, coeficiente de similaridade entre indivíduos (Gower 1971), no programa Multiv 2.4 (Pillar, 2006), incluindo todas as populações de *A. winkleri*. A partir deste índice foi realizada a construção de um dendrograma através do método UPGMA no programa NT-SYS 2.1 (Rohlf, 2000).

4.3 Resultados

Amplificação heteróloga e variação dos locos

Dos 37 locos descritos para a família Bromeliaceae, 13 amplificaram na espécie *Aechmea winkleri*. Porém, sete deles mostraram um padrão monomórfico e três amplificaram em poucos indivíduos, apesar das várias tentativas de otimização de protocolos realizadas (dados não mostrados). Sendo assim, três marcadores foram utilizados para o presente estudo.

Foram detectados 12 alelos nos três locos analisados, com uma média de 4,0 alelos por loco, variando de três a seis (Tabela 3). A população PG apresentou um alelo exclusivo para o loco VgC01. A heterozigiosidade observada e esperada, para todas as populações variou de 0,267 a 0,794 e de 0,557 a 0,701, respectivamente (Tabela 3). Os locos VgC01 e PaA10 apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,005$). O coeficiente de endocruzamento médio (F_{IS}) foi de 0,152 e o coeficiente total de endogamia (F_{IT}) variou de -0,253 a 0,630 (Tabela 3).

Diversidade e diferenciação genética das populações

Os índices de diversidade encontrados nas populações de *A. winkleri* estão apresentados na Tabela 4. Os resultados obtidos mostraram uma riqueza alélica variando de 3,56 a 3,67. A heterozigiosidade observada e esperada variou de 0,522 a 0,635 e de 0,568 a 0,653, respectivamente. O coeficiente de endocruzamento variou de 0,022 a 0,190, sendo significativos para todas as populações (Tabela 4).

A análise de variância molecular (AMOVA) das populações de *A. winkleri* para microssatélites nucleares mostrou que a maior proporção da variação genética ocorre devido a

diferenças dentro das populações (92%). O valor de $F_{ST} = 0,082$, indica estruturação genética moderada. (Tabela 5). Para os marcadores de cpDNA se observou uma alta estruturação ($F_{ST} = 0,151$ Tabela 5). Os valores de F_{ST} e fluxo gênico (Nm) par a par para as populações de *A. winkleri*, variaram de 0,048 a 0,131 e de 1,654 a 4,933, respectivamente (Tabela 6, todos os valores significativos).

Os resultados da análise Bayesiana indicaram um $K = 1$ (dados não mostrados). O dendrograma gerado a partir das distâncias genéticas demonstrou um agrupamento entre as populações UN e PP com alta similaridade e a população PG como a mais diferenciada (Figura 2).

Variação morfológica

O dendrograma obtido a partir do índice de Gower para *A. winkleri*, não apresentou separação entre as quatro populações em grupos distintos (Figura 3). Das características quantitativas avaliadas, para as populações UN, BU e PP, aquelas que apresentaram alguma diferença entre elas foram: 4, 5, 13, 14 e 19, mostrando que os indivíduos da população BU são ligeiramente maiores que nas demais populações (Tabela 2). Para os dados qualitativos foi possível observar leves diferenças na coloração da sépala das flores para alguns indivíduos, o que também não pôde ser associado à uma determinada população (dados não mostrados).

4.4 Discussão

Amplificação heteróloga

Os baixos índices de amplificação heteróloga observados neste estudo não estão de acordo com o que é sugerido na literatura para espécies de bromélias (Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008). Palma-Silva *et al.* (2009), em trabalho realizado com *Vriesea gigantea* utilizaram sete marcadores heterólogos em seu estudo. Barbará *et al.* (2009), em estudos conduzidos com quatro espécies do gênero *Alcantarea* utilizaram seis marcadores desenvolvidos para outras espécies. Em estudo realizado com a espécie poliplóide *Bromelia antiacantha* (Zanella, 2009), a autora encontrou índices de amplificação similares aos do

presente estudo, utilizando somente três marcadores heterólogos. Nem mesmo locos descritos para uma espécie da mesma subfamília (*B. antiacantha*, Zanella, 2009), apresentaram resultados satisfatórios, amplificando, porém, em alguns indivíduos (mais ou menos 40% do tamanho amostral), apresentando, três alelos. Estudo realizado com *Aechmea fulgens* apresentou bons padrões de amplificação com cinco marcadores descritos para as espécies *Pitcairnia geyskesii*, *Tillandsia fasciculata* e *Guzmania monostachya* (Almeida, 2006). Nenhum desses marcadores utilizados neste último estudo apresentou um padrão polimórfico de amplificação em *A. winkleri*. A principal limitação da utilização dos marcadores microsatélites é a necessidade de caracterização de locos espécie-específicos. Entretanto, embora mutações nas regiões flangeadoras das ilhas de SSR possam impedir sua amplificação, estudos têm demonstrado que “primers” desenvolvidos para uma determinada espécie são capazes de gerar produtos de amplificação homólogos àqueles já descritos, principalmente em espécies relacionadas (Primmer *et al.*, 2005; Barbará *et al.*, 2007/ b). *Aechmea winkleri* faz parte do grupo de bromélias mais recente da família Bromeliaceae (Givnish *et al.*, 2004), o que poderia explicar o baixo índice de amplificação heteróloga, devido ao fato de os “primers” descritos até o momento serem para espécies muito distantes. Os marcadores descritos para a subfamília Bromelioideae, do qual faz parte *Aechmea*, foram descritos para o gênero basal da subfamília (Schulte *et al.*, 2009), provavelmente também muito distante. Nada foi encontrado na literatura para discutir o fato de alguns marcadores amplificarem recorrentemente somente em poucos indivíduos de *A. winkleri*. Mais estudos são necessários para tentar entender este fato.

Diversidade genética e estruturação

Mesmo com a utilização de somente três locos de microsatélites para as análises, os resultados encontrados neste estudo mostraram-se muito próximos aos observados para outras espécies de bromélias, apesar de relativamente maiores ($H_0 = 0,556$). Estudo realizado com *V. gigantea* (Palma-Silva *et al.*, 2009) apresentou uma heterozigosidade observada média de 0,424. Barbará *et al.* (2009), estudaram duas espécies de bromélias endêmicas da costa do estado do Rio de Janeiro, *A. glaziouana* e *A. regina*, e encontraram valores médios de $H_0 = 0,299$ e 0,485, respectivamente. Já para a espécie *B. antiacantha* foi encontrado um valor

médio de heterozigosidade observada de 0,337 (Zanela, 2009). Estudos realizados com espécies do gênero *Aechmea* também encontraram valores inferiores de heterozigosidade observada. Para *A. magdalenae*, espécie da República do Panamá, em estudo realizado com aloenzimas, foi encontrado um valor médio de $H_O = 0,099$ (Murawski e Hamrick, 1990). Resultados próximos foram encontrados para *A. tuitensis*, uma bromélia de distribuição geográfica restrita a uma pequena área no México, com a heterozigosidade observada variando entre 0,042 a 0,091 (Izquierdo e Piñero, 2000). Entretanto, é preciso levar em consideração o fato de estudos realizados com aloenzimas apresentarem índices de heterozigosidade menores do que aqueles obtidos com microssatélites.

Espécies com distribuição geográfica restrita geralmente apresentam níveis mais baixos de diversidade genética que suas espécies relacionadas com uma distribuição mais ampla (Gitzendanner e Soltis, 2000). Os índices de diversidade observados para as populações de *A. winkleri* são semelhantes aos encontrados para espécies de bromélias com distribuição geográfica restrita, que utilizaram microssatélites nucleares para as análises (espécies do gênero *Alcantarea* – Barbará *et al.*, 2009), porém maiores quando comparados com espécies de bromélias com distribuição mais ampla (*V. gigantea* - Palma-Silva *et al.*, 2009; *B. antiacantha* - Zanela, 2009). Os índices de diversidade genética encontrados no presente estudo podem ser atribuídos, pelo menos parcialmente, ao fato da espécie ser autoincompatível (Büttow, em preparação). Espécies alógamas, ao contrário das autógamias, tendem a apresentar altos índices de variabilidade genética e baixa diferenciação genética entre as populações (Fischer *et al.*, 2000). Ainda, o fato de a espécie apresentar reprodução clonal acentuada (Goetze – observações a campo), facilita a manutenção dos “genets” e da variabilidade encontrada, como sugerido em outros estudos (Murawski e Hamrick, 1990; Sarthou *et al.*, 2001; González-Astorga *et al.*, 2004). Além disso, deve ser levado em consideração a hipótese de que a região onde ocorre *A. winkleri* pode ter servido de refúgio durante as mudanças climáticas do Pleistoceno (discutido no capítulo 2), o que também explicaria a diversidade encontrada.

As populações de *A. winkleri* apresentaram um índice de estruturação moderado ($F_{ST} = 0,082$), o que não é observado para a maioria das espécies de bromélias. Entretanto, não deve ser desconsiderado o fato de que as populações avaliadas no presente estudo estão

relativamente próximas geograficamente, diferente dos outros estudos citados. Murawski e Hamrick (1990), em trabalho realizado com *A. magdalena* encontraram um $F_{ST} = 0,356$, indicando forte estruturação. Já Izquierdo e Piñero (2000), encontraram para *A. tuitensis*, uma bromélia endêmica, um valor de $F_{ST} = 0,196$. Trabalho realizado com *B. antiacantha*, também da subfamília Bromelioideae (Zanella, 2009), obteve um $G_{ST} = 0,219$. Barbará *et al.* (2007/ a) em trabalho realizado com a espécie *Alcantarea geniculata* encontrou estruturação moderada entre as populações, $F_{ST} = 0,111$, estando este resultado relacionado a conectividade entre as populações e a sua distribuição geográfica restrita. Os dados encontrados no presente estudo também indicam haver uma conectividade entre as populações, uma vez que elas estão geograficamente muito próximas e distribuídas em uma região extremamente restrita. Nas comparações par a par dos valores de F_{ST} e número de migrantes (Nm), para as populações de *A. winkleri*, foi observado que a maioria das populações apresentou uma estruturação moderada e um número alto de migrantes por geração (Tabela 6). Foi observado ainda que as populações que apresentaram os maiores valores de F_{ST} (0,131) também são aquelas geograficamente mais distantes entre si (PG e PP, distantes em torno de 5 km).

A razão entre fluxo de pólen e de sementes foi de aproximadamente 0,03 para *A. winkleri*, ou seja, fluxo gênico mais eficiente via sementes. Em estudo semelhante realizado por Palma-Silva *et al.* (2009) com *V. gigantea*, os autores encontraram uma assimetria entre o fluxo de pólen e sementes, sendo o fluxo gênico via pólen cerca de 3,3 vezes mais eficiente do que via sementes. Estas diferenças podem ser explicadas pelo sistema de dispersão das sementes, que em *V. gigantea* ocorre pelo vento (Sazima *et al.*, 1999) e em espécies do gênero *Aechmea* é realizada por pássaros (Leme e Marigo, 1993). Estudo realizado com *A. lindenii* encontrou pássaros dos gêneros *Chiroxiphia*, *Tachyphonus* e *Tangara* como dispersores (Lenzi *et al.*, 2003).

Em todas as populações de *A. winkleri* foram encontrados valores significativos de endocruzamento (F_{IS}), variando de 0,022 a 0,190, mostrando haver um déficit de heterozigotos, apesar dos altos índices de heterozigosidade apresentados e discutidos acima. Como a espécie é alógama (Büttow, em preparação), este coeficiente de endocruzamento provavelmente indica um cruzamento entre indivíduos aparentados, o que pode ser explicado

pelo comportamento do polinizador mais frequente de *A. winkleri*, as abelhas (zangões), que visitam indivíduos próximos, provavelmente aparentados (Goetze – observações a campo).

A população União (UN) apresentou os menores índices de diversidade genética e o maior coeficiente de endocruzamento. Estes resultados podem estar associados ao comportamento dos polinizadores (abelhas e borboletas, mas ocorrendo também visitas esporádicas de beija-flores, Büttow, em preparação). Como as populações avaliadas estão separadas aproximadamente pela mesma distância geográfica, os valores de F_{ST} desta população com as demais indicam estruturação de moderada a baixa (Tabela 6). O alto coeficiente de endocruzamento e os baixos índices de diversidade apresentados indicam a limitação no deslocamento dos polinizadores e dos dispersores de sementes. A limitação no deslocamento do polinizador faz com que não ocorra troca de pólen proveniente de outros locais, promovendo o cruzamento entre indivíduos aparentados. Outra hipótese, não excludente da anterior, é que a população pode não estar atraindo polinizadores. Populações maiores e mais densas atraem mais polinizadores do que populações pequenas (por exemplo, Franceschinelli e Bawa, 2000). Porém estudos demográficos precisam ser realizados para a confirmação deste fato.

A população Parque da Gruta (PG) apresentou índices de diversidade genética mais altos do que as demais populações. Esta população localiza-se em um Parque de 17,7 hectares, com uma vegetação ainda bem preservada. Por ser um Parque, é a área dentro do Cinturão Verde menos impactada, não sofrendo com os constantes desmatamentos realizados principalmente pela construção civil.

Conclusões e estratégias de conservação

Os parâmetros de diversidade e estrutura genéticos estimados neste trabalho indicam que as populações de *A. winkleri* apresentam altos índices de diversidade genética e fluxo gênico moderado entre as populações, ao contrário do que tem sido observado em outras espécies de bromélias. Apresenta ainda uma alta variação morfológica, onde não é possível observar a formação de uma identidade para cada população. Apesar disso, a espécie está distribuída em uma área geográfica restrita, sendo somente sete populações conhecidas atualmente. A área onde as populações ocorrem está sofrendo uma forte pressão antrópica, sendo a área a mais

visada no município pela construção civil. Apesar do Cinturão Verde ser considerado uma Área de Proteção Ambiental (APA), há lacunas na lei que permitem a derrubada da mata e construção de condomínios fechados dentro da área demarcada como APA. Além disso, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa indicam que *A. winkleri* é uma espécie alógama, ou seja, dependente da ação de polinizadores para a sua fertilização. Pelo fato das populações apresentarem baixos índices de diferenciação genética e morfológica, propostas de conservação “in situ” para a espécie deveriam dar prioridade às populações maiores. Porém, como foi observado no presente estudo, as populações apresentam subestruturação, com índices de endocruzamento significativos, não se constituindo em unidades panmíticas. Para que as populações de *A. winkleri* se mantenham é necessário a conservação do maior número possível de populações, para que a diversidade genética e morfológica observadas nas populações não sejam perdidas. Além disso, toda a biota envolvida com as bromélias, como os polinizadores, a microfauna que cresce em seus tanques e os animais que dela se alimentam, são dependentes da persistência da espécie. A área do Cinturão Verde faz parte dos primeiros contrafortes da Serra Geral, um ambiente de transição entre os biomas Pampa e Mata Atlântica, sendo apesar disso pouco conhecido e estudado.

Tabela 1. Populações de *Aechmea winkleri* encontradas e amostradas (*) no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul. ID = nome da população.

ID	Localidade	Latitude S	Longitude W
PG*	Parque da Gruta	29°42'34.8	52°24'20.0
UN*	União	29°41'39.2	52°25'15.0
RE	Retiro	29°41'38.7	52°25'20.2
RP	Reserva dos Pássaros	29°41'34.4	52°25'40.7
BU*	Bairro Universitário	29°41'28.7	52°26'09.4
PP*	Pinus Parque	29°40'46.3	52°25'56.9
PI	Pinheral	29°41'38.4	52°22'48.5

Tabela 2. Características morfológicas quantitativas avaliadas em três populações de *Aechmea winkleri*. Dados apresentados como média ± erro padrão.

Características	Populações		
	WUNRS (20)*	WBURS (20)*	WPPRS (20)*
1 - Número de ramificações na inflorescência	12,90 ± 0,680	13,00 ± 1,003	12,30 ± 0,912
2 - Comprimento da flor (mm)	20,34 ± 0,360	21,34 ± 0,340	21,29 ± 0,298
3 - Comprimento da raque (cm)	12,42 ± 0,522 ^b	15,12 ± 0,698 ^a	12,98 ± 0,667 ^{ab}
4 - Largura inferior da inflorescência (cm)	6,26 ± 0,245 ^b	7,76 ± 0,218 ^a	6,78 ± 0,346 ^b
5 - Altura do primeiro nó da inflorescência (cm)	7,42 ± 0,574 ^b	11,80 ± 0,823 ^a	8,72 ± 0,64 ^b
6 - Comprimento do escapo (cm)	31,48 ± 0,936 ^b	36,70 ± 1,241 ^a	34,15 ± 1,458 ^{ab}
7 - Comprimento da 3ª folha (cm)	48,88 ± 2,062 ^b	56,21 ± 2,104 ^a	54,25 ± 2,091 ^{ab}
8 - Largura da 3ª folha (cm)	3,74 ± 0,103	3,98 ± 0,096	3,97 ± 0,101
9 - Número de flores	102,50 ± 7,484	113,15 ± 10,028	112,95 ± 10,300
10 - Área da inflorescência (cm ²)	12,76 ± 0,571 ^b	16,53 ± 0,510 ^a	14,46 ± 0,789 ^{ab}
11 - Relação comprimento/ largura da folha (cm)	13,38 ± 0,809	14,28 ± 0,619	13,88 ± 0,720
12 - Densidade da inflorescência	0,13 ± 0,006	0,15 ± 0,010	0,13 ± 0,008
13 - Comprimento da sépala (mm)	13,64 ± 0,324 ^b	14,82 ± 0,243 ^a	14,39 ± 0,225 ^a
14 - Comprimento da pétala (mm)	11,51 ± 0,170 ^b	12,18 ± 0,167 ^a	11,48 ± 0,147 ^b
15 - Largura da pétala (mm)	4,01 ± 0,066 ^b	4,37 ± 0,064 ^a	4,40 ± 0,083 ^a
16 - Comprimento da bráctea floral (mm)	6,43 ± 0,337 ^b	7,62 ± 0,250 ^a	7,52 ± 0,338 ^a
17 - Largura da bráctea floral (mm)	2,73 ± 0,068	2,84 ± 0,113	2,73 ± 0,065
18 - Largura da base da flor (mm)	2,38 ± 0,055 ^b	2,66 ± 0,067 ^a	2,54 ± 0,053 ^{ab}
19 - Comprimento do estilete (mm)	10,07 ± 0,141 ^b	11,66 ± 0,364 ^a	10,65 ± 0,148 ^b
20 - Comprimento do estame (mm)	9,96 ± 0,153	10,50 ± 0,204	10,22 ± 0,113
21 - Comprimento da antera (mm)	4,16 ± 0,089	4,24 ± 0,100	4,26 ± 0,084
22 - Comprimento do filete (mm)	8,16 ± 0,152	8,20 ± 0,277	7,85 ± 0,144

* Número de indivíduos amostrados.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias segundo teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 3. Caracterização genética e sumário das estatísticas F, para três locos de microssatélites nucleares, em quatro populações de *Aechmea winkleri*. N = tamanho da amostra; A = número de alelos por loco; H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; F_{IT} = coeficiente total de endogamia; F_{IS} = coeficiente de endocruzamento.

Loco	N	A	H_O	H_E	F_{IT}	F_{IS}
VgC01	126	6	0,608	0,701	0,233	0,136***
PaA10	123	3	0,267	0,557	0,630	0,587***
PaC05	130	3	0,794	0,633	-0,253	-0,266
Média	126,3	4,0	0,556	0,630	0,203	0,152

*** $P < 0,005$.

Tabela 4. Diversidade genética das populações de *Aechmea winkleri*, para três locos de microssatélites nucleares. ID = nome da população; N = tamanho amostral; R_S = riqueza alélica; H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; F_{IS} = coeficiente de endocruzamento.

Populações	N	R_S	H_O	H_E	F_{IS}
PG	20	3,67	0,635	0,653	0,022***
UN	37	3,56	0,531	0,650	0,190****
BU	38	3,58	0,537	0,651	0,169****
PP	39	3,59	0,522	0,568	0,173****

*** $P < 0,005$; **** $P < 0,001$.

Tabela 5. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para *Aechmea winkleri*.

Fonte da variação	df	SS	Varição (%)	F _{ST}
Microssatélites nucleares				
Entre populações	3	19,964	8	0,082****
Dentro de populações	272	255,705	92	
Microssatélites de cloroplasto				
Entre populações	3	7,495	15	0,151****
Dentro de populações	55	37,929	85	

**** $P < 0,001$.

Tabela 6. Divergência genética (F_{ST}: abaixo da diagonal) e fluxo gênico (Nm: acima da diagonal) para populações aos pares de *Aechmea winkleri*.

Populações	PG	UN	BU	PP
PG	-	2,234	2,167	1,654
UN	0,101	-	4,933	4,037
BU	0,103	0,048	-	2,451
PP	0,131	0,058	0,093	-

Todos os valores de $P < 0,001$.

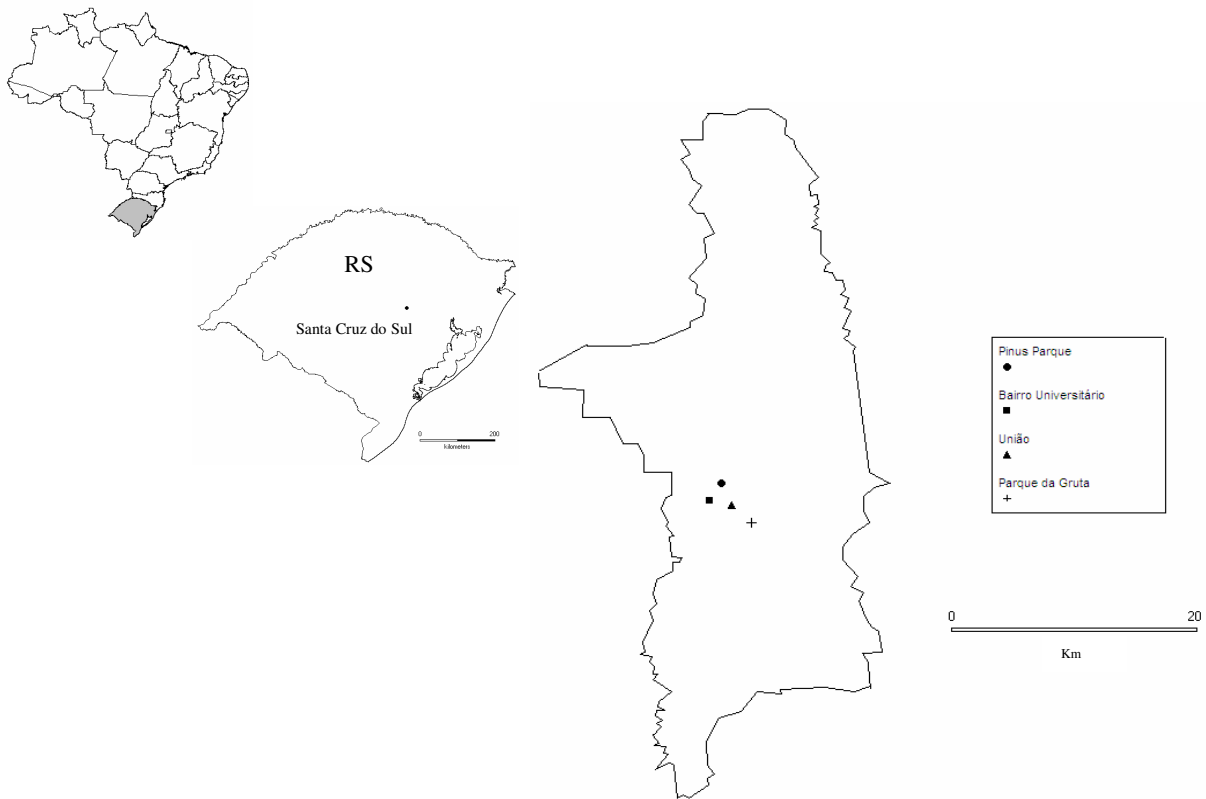


Figura 1: Mapa da distribuição geográfica das populações de *Aechmea winkleri* amostradas para as análises de diversidade genética.

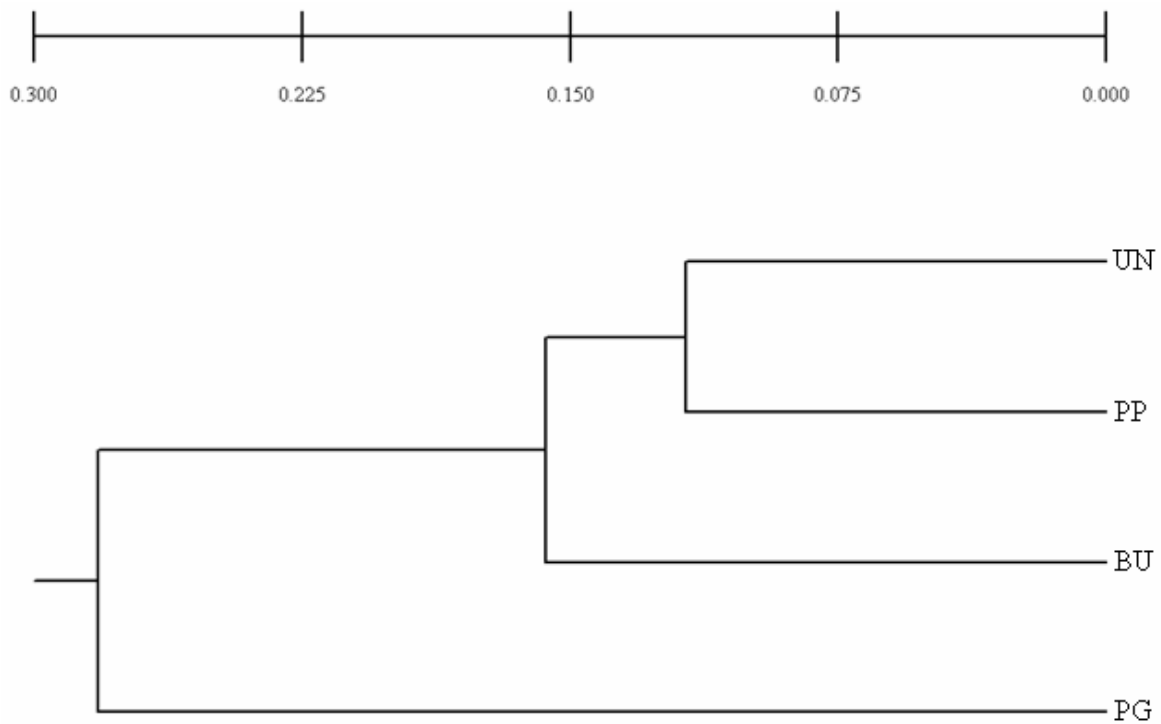


Figura 2. Dendrograma obtido a partir da distância D de Nei (1972), baseada em três locos de microssatélites nucleares, incluindo quatro populações de *Aechmea winkleri*. PG = Parque da Gruta; UN = União; BU = Bairro Universitário; PP = Pinus Parque.

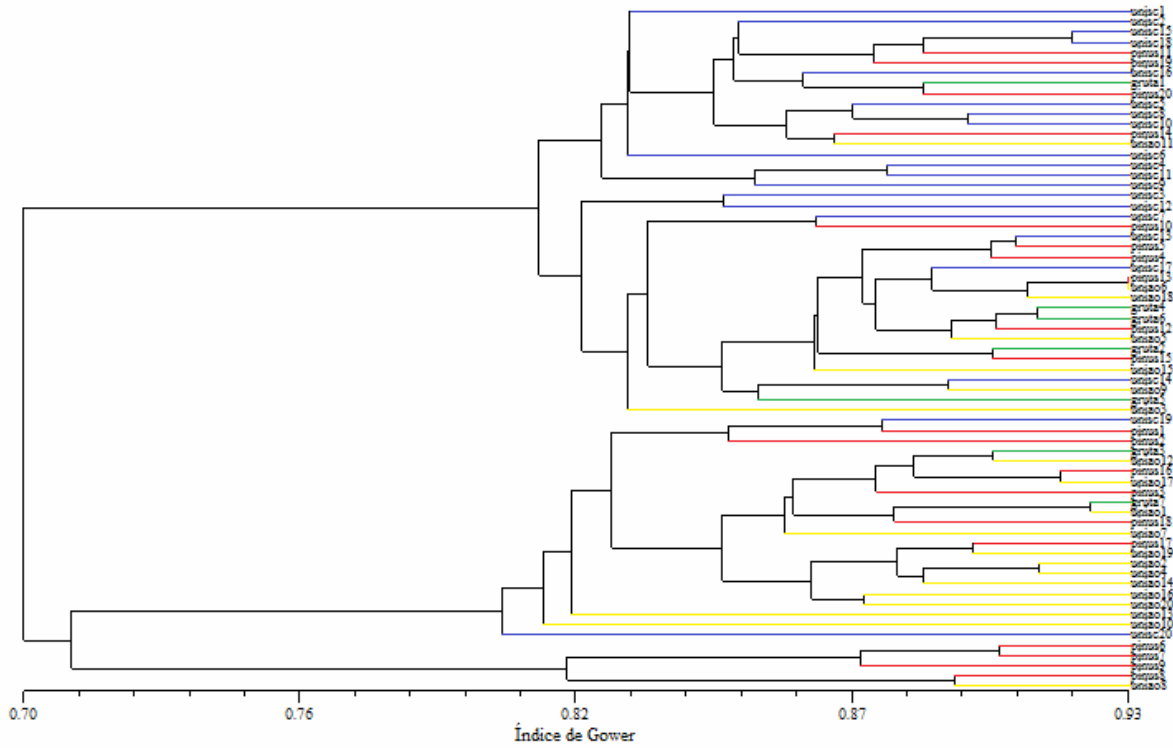


Figura 3. Dendrograma obtido a partir do índice de Gower, baseado em 22 caracteres morfológicos quantitativos e quatro caracteres morfológicos qualitativos para 67 indivíduos avaliados de *Aechmea winkleri*. Em verde indivíduos da população Parque da Gruta; amarelo população União; azul população Bairro Universitário; vermelho população Pinus Parque.

Capítulo 5
Considerações Finais

Considerações Finais

A presente dissertação está dividida em três capítulos que visam contribuir para os estudos genéticos e biológicos da família Bromeliaceae, principalmente de espécies em risco ou perigo de extinção e que ocorrem no Sul e Sudeste do Brasil. Além disso, resolver problemas de delimitação taxonômica do gênero *Aechmea*. Tais informações serão fundamentais para a conservação e manejo destes recursos genéticos disponíveis na natureza. Este estudo contribuirá no entendimento dos padrões filogeográficos, diversidade genética e variação morfológica das populações de *Aechmea caudata* e *A. winkleri*, assim como para esclarecer o relacionamento evolutivo entre estas duas espécies.

Por serem espécies com problemas de delimitação taxonômica e ameaçadas de extinção, *A. caudata* e *A. winkleri* tornaram-se alvo deste estudo. São espécies pouco conhecidas, não existindo nenhuma informação sobre aspectos básicos, além de apresentarem um alto potencial ornamental, sofrendo coleta predatória.

Para tentar esclarecer o relacionamento de *A. caudata* e *A. winkleri*, foi realizada uma abordagem filogeográfica utilizando microssatélites de cloroplasto, além de estudos de variação morfológica. Este estudo revelou 41 haplótipos, sendo 12 compartilhados entre as duas espécies. Identificou que ocorre menor variação genética entre as espécies do que dentro das populações para cada espécie, e a formação de grupos distintos a partir de análises morfológicas. Apesar dos resultados indicarem um relacionamento complexo entre as espécies, a distinção das taxa como duas espécies distintas é parcialmente suportada. Duas populações apresentaram os maiores índices de diversidade para *A. caudata*, Florianópolis e Guarujá. Pelos altos índices de diversidade apresentados pela espécie *A. winkleri*, acredita-se que a região onde ela ocorre atualmente, centro do estado do Rio Grande do Sul, nas encostas da Serra Geral, pode ter servido como refúgio, sendo aquelas populações antigas.

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *A. winkleri* não foram validados, apesar de todas as tentativas realizadas. Não foi possível identificar o problema que possa ter ocorrido. Os demais clones recombinantes obtidos na construção da biblioteca deverão ser sequenciados para uma nova construção de “primers”.

Os estudos de diversidade genética e estruturação populacional demonstraram que *A. winkleri* possui altos índices de variabilidade genética, comparados aos encontrados para outras espécies de bromélias (Barbará *et al.*, 2007; 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009, Zanella, 2009). *Aechmea winkleri* apresentou uma estruturação populacional moderada, com baixa diferenciação genética entre as populações. O sistema de cruzamento alógamo (Büttow, em preparação), o sistema de dispersão das sementes (pássaros Leme e Marigo, 1993) e a conectividade entre as populações estão provavelmente mantendo a homogeneização das populações. Ocorre uma grande variação morfológica entre as populações de *A. winkleri*, o que corrobora a diversidade genética observada e a baixa diferenciação entre as populações.

Os resultados acima citados são muito úteis para o entendimento dos processos que moldaram a grande biodiversidade observada na Mata Atlântica, além de auxiliar no estabelecimento de planos de manejo e conservação de *A. caudata* e *A. winkleri*.

Capítulo 6
Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Albach DC, Schönswetter P e Tribsch A (2006) Comparative phylogeography of the *Veronica alpine* complex in Europe and North America. *Mol Ecol* 15: 3269-3286.
- Almeida CMA (2006) Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 60 pp.
- Alves EL e Collischonn E (2001) Cinturão Verde: da preservação a especulação – uma análise ambiental. Laboratório de Geoprocessamento/ Universidade de Santa Cruz do Sul, CD-ROM.
- Alves GM, Filho AR, Puchalski A, Reis MS, Nodari RO e Guerra MP (2004) Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic Forest. *Plant Genetic Resources* 2: 23-28.
- Andrade FSA e Demattê MESP (1999) Estudo sobre produção e comercialização de bromélias nas regiões sul e sudeste do Brasil. *Rev Bras Hortic Ornament* 5: 97-110.
- Armour JA, Neumann R, Gobert S e Jeffreys AJ (1994) Isolation of human simple repeats loci by hybridization selection. *Hum Mol Genet* 3: 599-565.
- Araki NHT, Khatab IA, Hemamali KKGU, Inomata N, Wang X-R e Szmidt AE (2008) Phylogeography of *Larix sukaczewii* Dyl. and *Larix sibirica* L. inferred from nucleotide variation of nuclear genes. *Tree Genet Genomes* 4: 611-623.
- Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol Ecol* 7: 371-379.

- Bandelt H-J, Forster P e Röhl A (1999) Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ e Lexer C (2007/ a) 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 e Lexer C (2007/ b) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potencial and limitations. *Mol Ecol* 16: 3759-3767.
- Barbará T, Lexer C, Martinelli G, Mayo S, Fay MF e 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 e Lexer C (2009) Genetic relationship and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* e *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 103: 65-77.
- Barfuss MHJ, Samuel R, Till W e Stuessy TF (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Am J Bot* 92: 337-351.
- Barros NM, Silva JAB, Miyaki CY e Morgante JA (2006) Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). *Genetica* 126: 189-198.
- Behling H (1995) Investigations into the Late Pleistocene and Holocene history of vegetation and climate in Santa Catarina (S Brazil). *Veget Hist Archaeobot* 4: 127-152. Abstract.

- Behling H e Pillar VD (2007) Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the southern Brazilian highland and their implication for conservation and management of modern *Araucaria* Forest and grassland ecosystems. *Phil Trans R Soc B* 362: 243-251.
- Bennett BC, Baker MA e Gomez P (2001) Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador. *Adv Econ Bot* 14: 1-299.
- Benzing DH (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 690 pp.
- Bered F, Kaltchuk-Santos E, Palma-Silva C e Paggi GM (2008) Bromélias – A beleza exótica do Novo Mundo. In: Barbieri RL, Stumpf ERT (Eds) *Origem e evolução de plantas cultivadas*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 235-251 pp.
- Bermingham E e Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol Ecol* 7: 367-369.
- Billote N, Risterucci A-M e Baurens F-C (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.
- Boneh L, Kuperus P e Van Tienderen PH (2003) Microsatellites in bromeliads *Tillandsia faciculata* and *Guzmania monostachya*. *Mol Ecol Notes* 3: 302-303.
- Byrne M, Macdonald B e Coates D (2002) Phylogeographical patterns in chloroplast DNA variation within the *Acacia acuminata* (Leguminosae: Mimosoideae) complex in Western Australia. *J. Evol. Biol.* 15: 576-587.
- Carnaval AC, Hicherson MJ, Haddad CFB, Rodrigues, MT e Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Caruso Jr F, Suguio K e Nakamura T (2000) The quaternary geological history of the Santa Catarina Southeastern Region (Brazil). *An Acad Bras Ci* 72: 257-270.

- Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI e Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Epinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodivers Conserv* 15: 4357-4373.
- Cavallero L, López D e Barberis IM (2009) Morphological variation of *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) in a Chaco forest: habitat and size-related effects. *Plant Biol* 11: 379-391.
- Cathcart DJ (1995) The importance of maintaining bromeliads imports. *Florida Entomologist* 78: 16-21.
- Ceita GO, Assis JGA, Guedes MLS e Oliveira ALPC (2008) Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. *Biol J Linn Soc* 158: 189-193.
- Cifarelli RA, Gallitelli M e Cellini F (1995) Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucleic Acids Res* 23: 3802-3803.
- Clegg MT e Zurawski G (1992) Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In: Soltis PS, Soltis DE e Doyle JJ (eds.) *Molecular Systematics of Plants*. Chapman & Hall, New York, pp. 1-13.
- Coffani-Nunes JV (2002) Bromélias. In: Simões LL e Lino CF (org.) *Sustentável Mata Atlântica – a exploração de recursos vegetais*. Senac, São Paulo, pp. 119-132.
- Collevatti RG, Grattapaglia D e Hay JD (2003) Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotypes variation. *Mol Ecol* 12: 105-115.
- Collischon E (2001) O espaço natural na região do Vale do Rio Pardo - algumas considerações. In: Vogt OP e Silveira RLL (org) *Vale do Rio Pardo: (re) conhecendo a região*. Edunisc, Santa Cruz do Sul, pp. 19-46.

- Costa AF (2002) Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 187 pp.
- Costa AF, Rodrigues PJFP e Wanderley MGL (2009) Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 159: 163-181.
- Culver M, Menotti-Raymond MA e O'Brien SJ (2001) Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in Pumas (*Puma concolor*). *Mol Biol Evol* 18: 1151-1156.
- Dieringer D e Schlotterer C (2003) Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3: 167-169.
- Doyle JJ e Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C e Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellites sequences in plants. *BioTechniques* 20: 758.
- El Mousadik A e Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic of Morocco. *Theor Appl Genet* 92: 832-839.
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant-population. *Heredity* 72: 250-259.
- Ennos RA, Sinclair WT, Hu X-S, Langdon a (1999) Using organelle markers to elucidate the history, ecology, and evolution of plants populations. In: Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ (eds) *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, London, pp. 1-19.
- Estoup A, Tailliez C, Corneet JM e Solignac M (1995) Size homoplasy and mutational process of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol Biol Evol* 12: 1074-1084.

- Faria APG, Wendt T e Brown GK (2004) Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Ann Mo Bot Gard* 91: 303-319.
- Faria APG, Wendt T e Brown GK (2010) A revision of *Aechmea* subgenus *Macrochordion* (Bromeliaceae) based on phenetic analyses of morphological variation. *Bot J Linn Soc* 162: 1–27.
- Fischer M e Matthies D (1998) RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *Am J Bot* 85: 811-819.
- Fischer M, Husi R, Prati D, Peintinger M, Kleunen MV e Schmid B (2000) RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am J Bot* 87: 1128-1137.
- Franceschinelli EV e Bawa KS (2000) The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* 84: 116-123.
- Freitas CA, Scarano FR e Biesboer DD (2003) Morphological variation in two facultative epiphytic bromeliads growing on the floor of a swamp forest. *Biotropica* 35: 546-550.
- Gitzendanner MA e Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot* 87: 783-792.
- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE e Systsma JK (2004) Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south american-african disjunctions in Rapataceae and Bromeliaceae based on *ndhf* sequence data. *Int J Plant Sci* 165 (4 Suppl.): S35-S54.
- Givnish TJ, Milliam KC, Berry PE e Sytsma KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23:3-26.

- González-Astorga J, Cruz-Angón A, Flores-Palacios A e Vovides AP (2004) Diversity and genetic structure of the mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. Ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 94: 545-551.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Heredity* 86: 485-486.
- Gower JC (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27: 857-874.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S e Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol* 15: 3969-3982.
- Horres R, Schulte K, Weising K e Zizka G (2007) Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso* 23: 27–43.
- Izquierdo LY e Piñero D (2000) High genetic in the only know population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Aust J Bot* 48: 645-650.
- Jarne P e Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11: 424-430.
- Karagyozov L, Kalcheva ID e Chapman VM (1993) Construction of random small-insert genomic libraries highly enriches for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Res* 21: 3911-3912.
- Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA e Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques* 16: 656-660.
- King RA e Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Mol Ecol* 7: 1151-1161.

- Knowles LL e Carstens BC (2007) Delimiting species without monophyletic gene trees. *Syst Biol* 56: 887-895.
- Ledru MP, Salatino MLF, Ceccantini G, Salatino A, Pinheiro F e Pintaud JC (2007) Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Diversity Distrib* 13: 761–771.
- Leme EMC e Marigo LC (1993) Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro, 183 pp.
- Lenzi M, Matos, JZ e Orth AI (2006) Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var: *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Bot Bras* 20: 487-500.
- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA e Provan J (2003) Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Mol Ecol* 12: 3219-3225.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM e Freitas LB (2005) Phylogeography inferences concerning evolution of brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Ann Bot* 95: 799-806.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15: 4487-4497.
- Luther HD (2006) An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. The Bromeliad Society International, Sarasota, Florida.
- Marcussen T (2003) Evolution, phylogeography and taxonomy within the *Viola alba* complex (Violaceae). *Plant Syst Evol* 237: 51-74.

- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa A e Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59 (1): 209-258.
- Medina E (1990) Eco-fisiologia y evolución de las Bromeliaceae. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias* 59: 71-100.
- Miller M (1997) Tools for population genetics analysis (TFPGA): 1.3 a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Morellato LPC e Haddad CFB (2000) Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786-792.
- Morse GE e Farrell BD (2005) Interspecific phylogeography of the *Stator limbatus* species complex: the geographic context of speciation and specialization. *Mol Phylogenet Evol* 36: 201-213.
- Murawski AD e Hamrick JL (1990) Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *Am J Bot* 77: 1201-1208.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB e Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nei M (1972) Genetic distances between populations. *Am Nat* 106: 283-292.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T e Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic rain forest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Resou* 8: 980-982.

- Palma RE, Marquet PA e Boric-Bargetto D (2005) Inter- and intraspecific phylogeography of small mammals in the Atacama Desert and adjacent areas of northern Chile. *J Biogeogr* 32: 1931-1941.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbara T, Lexer C, Gimenes A, Bered F e Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads species. *Mol Ecol Notes* 7: 265-267.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F e 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.
- Peakall R e Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reserch. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY e Sites Jr JW (2008) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc* 85: 13-26.
- Petit RJ, El Mousadik A e Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol* 12: 844-855.
- Petit RJ e Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends Ecol Evol* 24: 386-393.
- Pillar VD (2006) MULTIV: Multivariate exploratory analysis, randomization testing and bootstrap resampling. User's Guide versão 2.4 Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 51 pp.

- Porembski S e Barthlott W (1999) *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. Harv Paper Bot 4: 175-184.
- Powell W, Macharay GC e Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci 1: 215-222.
- Primmer CR, Painter JN, Koskinen MT, Palo JU e Merila J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. J Avian Biol 36: 348 - 360.
- Pritchard JK, Stephens M e Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
- Provan J, Powell W, Hollinstworth PM (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. Trends Ecol Evol 16: 142-147.
- Qamaruz-Zaman F, Fay MF, Parker JS e Chase MW (1998) Molecular techniques employed in the assessment of genetic diversity: a review focusing on orchid conservation. Lindleyana 13: 259-283.
- Rambo, B (1994) A fisionomia do Rio Grande do Sul. Editora Unisinos, São Leopoldo, 456 pp.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR e Lovato MB (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. Ann Bot 100: 1219-1228.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP e Lovato MB (2009) Phylogeographical structure of the Neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. J Heredity 100: 206-216.
- Raymond M e Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Heredity 86: 248-249.

- Reitz R (1975) Encontro e reencontro de bromélias II *Aechmea winkleri*. *Sellowia* 26: 63-67.
- Reitz R (1983) Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense* Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 808 pp.
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter Software.
- Sales E, Nebauer SG, Mus M e Segura, J (2001) Population genetic study in the balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. *Am J Bot* 88: 1750-1759.
- Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro M e Margis R (2004) Even population differentiation for maternal and biparental genemarkers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Diversity Distrib* 10: 201–210.
- Sarthou C, Samadi S, Marie-Catherine e Dubayle B (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *Am J Bot* 88: 861-868.
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J e 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.
- Sazima M, Buzato S e Sazima I (1999) Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. *Ann Bot* 83: 705-712.
- Schlötterer C e Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20: 211-215.

- Schulte K, Horres R, Zizka G (2005) Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). *Senckenbergiana Biol* 85: 113–125. Abstract
- Schulte K e Zizka G (2008) Multi locus plastid phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) and the taxonomic utility of petal appendages and pollen characters. *Candollea* 63: 209-225. Abstract
- Schulte K, Barfuss MHJ e Zizka G (2009) Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Mol Phylogenet Evol* 51: 327-339.
- Sgorbati S, Labra M, Gruni E, Barcaccia G, Galasso G, Boni U, Mucciarelli M, Citterio S, Iramátegui AB, Gonzáles LV e Scannerini S (2004) A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biol* 6: 1-9.
- Shaw J e Small RL (2005) Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the north american plums (*Prunus* subgenus *Prunus* section *Prunocerasus*, Rosaceae). *Am J Bot* 92: 2011-2030.
- Sites Jr JW e Marshall JC (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol Evol* 18: 462-470.
- Smith LB (1934) Geographical evidence on the lines of evolution in Bromeliaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 66: 446-468.
- Smith LB e Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcarnioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 1-662.
- Smith LB e Downs RJ (1977) Bromeliaceae (Tillandsioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 663-1492.

- Smith LB e Downs RJ (1979) Bromelioideae (Bromelioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 1443-2142.
- Soltis DE, Gilmartin J, Rieseberg L e Gardner S (1987) Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 74: 531-537.
- Soranzo N, Provan J e Powell W (1999) An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42: 158-161.
- Stefenon VM, Behling H, Gailing O e Finkeldey R (2008) Evidences of delayed size recovery in *Araucaria angustifolia* populations after post-glacial colonization of highlands in Southeastern Brazil. *An Acad Bras Ci* 80: 433-443.
- Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota M, e Bedê L (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conserv Biol* 19: 695-700.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471.
- Vervaeke I, Wouters J, Londers E, Deroose R e Proft MP (2004) Morphology of artificial hybrids of *Vriesea splendens* x *Tillandsia cyanea* and *V. splendens* x *Guzmania lingulata* (Bromeliaceae). *Ann Bot Fenn* 41: 201-208.
- Wanderley MGL e Martins SE (2007) Bromeliaceae. In: Wanderley MGL, Shepherd GJ, Melhem TS e Giulietti AM (coords.) *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 5, pp. 39-161.
- Wang ZJ, Weber L, Zhong Z e Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet* 88: 1-6.
- Weir BS e Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

- Wendt T, Canela MBF, Morrey-Jones JE, Henriques AB, Rios RI (2000) Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. *Syst Bot* 25: 389-398.
- Wendt T, Coser TS, Matallana G e Guilherme FAG (2008) An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 275: 31-41.
- Wiens JJ (2007) Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst Biol* 56: 875-878.
- Wolfe KH, Wen-Hsiung L e Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *P Natl Acad Sci USA* 84: 9054-9058.
- Wu K, Jones R, Danneberger L e Scolnik PA (1994) Detection of microsatellites polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res* 22: 325-3258.
- Yang J, Li S, Sun G, Yuan Y e Zhao G (2008) Population structure and genetic variation in the genus *Dipteronia* Oliv. (Aceraceae) endemic to China as revealed by cpSSR analysis. *Pl Syst Evol* 272: 97-106.
- Zanella CM (2009) Caracterização genética, morfológica e fitoquímica de populações de *Bromelia antiacantha* (Bertol.) do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 96 pp.
- Zhang AB, Kubota K, Takami Y, Kim JL, Kim JK e Sota T (2005) Species status and phylogeography of two closely related *Coptolabrus* species (Coleoptera: Carabidae) in South Korea inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol Ecol* 14: 3823–3841.
- Zink RM, Pavlova A, Drovetski S, Wink M e Rohwer S (2009) Taxonomic status and evolutionary history of the *Saxicola torquata* complex. *Mol Phylogenet Evol* 52: 769-773.