

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

FERNANDA CAPRA

Diversidade e estruturação genética em populações
de *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), uma espécie
endêmica de Santa Catarina

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

FERNANDA CAPRA

Diversidade e estruturação genética em populações
de *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), uma espécie
endêmica de Santa Catarina

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao Departamento de
Genética do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como parte dos requisitos para a
obtenção do diploma de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Prof.^a Dr.^a. Fernanda Bered
Orientadora

Porto Alegre, 2012

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fernanda Bered, por, além de ter me escolhido como bolsista me dando a oportunidade de trabalhar com essa disciplina que eu tanto gosto, ter sido uma ótima orientadora, compreensiva e paciente, sempre muito querida.

Aos meus colegas do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, Márcia Goetze, Camila M. Zanella, Miriam Büttow, Felipe Grillo Pinheiro, Aline Janke e Eduardo Soares. Em especial à Márcia por ter me ensinado praticamente tudo, e ensinar novamente as coisas que eu esquecia, sempre paciente e bem humorada mesmo nas minhas horas de pânico, à Miriam pelos ensinamentos iniciais sempre muito tranquila e paciente, e à Camila que também deu muita força e incentivo, me ajudando especialmente com a teoria.

À minha família, especialmente aos meus pais, Sandra J. Zabala e Carlos A. Capra, pois com sua luta diária me deram oportunidade de entrar numa ótima universidade, ao meu irmão, Pedro Capra, por ter sido um modelo pra mim por muito tempo, e à minha irmã Paula Capra, minha companheira desde o útero e companheira de mesa até hoje, que me ajudou a descontrair em vários momentos de estudos prolongados.

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo Marcelo Schramm, pelo incentivo, paciência, carinho e por tentar me tranquilizar em muitos momentos mesmo não dando certo na maioria das vezes.

Aos professores das disciplinas de Genética II e Evolução, que introduziram o conteúdo de genética de populações e genética da conservação, pelo qual eu me apaixonei.

A todos os meus colegas de 2009/1 e outras barras pelas palavras de apoio e encorajamento.

À Macrogem pelos serviços, pois se eu tivesse que genotipar tudo em gel de acrilamida eu teria levado o dobro do tempo e teria perdido muitos cabelos.

Ao CNPq e à FAPERGS pela bolsa, que não deixa de ser um incentivo.

A todos que contribuíram de alguma forma!

Muito Obrigada!

*"If you want to catch beasts you don't see every day,
You have to go places quite out of the way,
You have to go places no others can get to.
You have to get cold and you have to get wet, too."*

- Dr. Suess

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	5
1.1. Diversidade genética em populações naturais e conservação	5
1.2. A Mata Atlântica e a Família Bromeliaceae	6
1.3. O Gênero <i>Aechmea</i> e <i>Aechmea kertsziae</i> (Reitz)	7
1.4. Objetivo	9
2. ARTIGO	10
3. PERSPECTIVAS	42
4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	42

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Diversidade genética em populações naturais e conservação

Na ausência de pressões seletivas, o fluxo gênico reduzido entre populações, pode resultar em padrões evidentes de estruturação genética intraespecífica, ao ponto de que efeitos homogeneizantes não são suficientes para neutralizar a divergência pela deriva genética aleatória (Wright, 1951). Além disso, fatores como o cruzamento entre indivíduos aparentados, comumente observado em populações de tamanho reduzido, leva a perda da diversidade genética, ou seja, a divergência genética ocorre mais rapidamente (Nei et al., 1975). Em curto prazo, populações nas condições acima citadas, podem reduzir a reprodução e a sobrevivência e, em longo prazo, diminuir a capacidade de evoluírem em resposta as mudanças ambientais, aumentando o risco de extinção (Frankham et al., 2008).

Fatores relacionados à ação antrópica frequentemente reduzem as populações a tamanhos nos quais as espécies ficam suscetíveis a efeitos acidentais ou estocásticos. Por isso, a investigação desses aspectos em populações naturais é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo, especialmente para espécies raras, em perigo de extinção, com poucas e/ou pequenas populações e com sistemas reprodutivos que dificultam o manejo (Frankham et al., 2008; Gitzendanner et al., 2012).

A genética da conservação é o uso da teoria e técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas. Seu objetivo é preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais, através da elucidação de aspectos da biologia das espécies, relevantes para seu manejo e conservação, como, por exemplo, avaliar a existência de fluxo gênico entre populações e determinar se elas diferem suficientemente, do ponto de vista genético, para justificar um manejo separado. Essas informações contribuem para o estabelecimento de estratégias de conservação, visando maximizar a retenção da diversidade genética e minimizar o endocruzamento (Barbieri, 2003; Frankham et al., 2003). Estudos filogeográficos têm sido utilizados para investigar os efeitos de mudanças climáticas do passado na estrutura genética de espécies animais e vegetais permitindo a inferência sobre a evolução de espécies dentro de biomas, o que também pode ser utilizado como

subsídio para estratégias de conservação (Bermingham e Moritz, 1998; Ramos et al., 2007).

1.2. A Mata Atlântica e a Família Bromeliaceae

A Mata Atlântica é um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica do Planeta. Apesar disso, restam apenas cerca de 7,3% de sua cobertura florestal original, tendo sido inclusive identificada como a quinta área mais ameaçada e rica em espécies endêmicas do mundo. Nesta floresta, Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos mais relevantes, devido ao alto grau de endemismo e expressivo valor ecológico decorrente principalmente de sua interação com a fauna (Martinelli et al., 2008).

A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 3.100 espécies distribuídas em 58 gêneros (Luther, 2008; Givnish et al., 2011), e está entre as famílias de maior riqueza e diversidade da Mata Atlântica (Martinelli et al., 2008). Podem ser encontradas em praticamente todos os ecossistemas neotropicais, desde o nível do mar, em praias, mangues e restingas, até altitudes de 5.000m, nos Andes. Podem ser terrestres, epifíticas ou rupículas (Medina, 1990; Leme & Marigo, 1993).

As bromélias são ervas perenes que combinam uma grande variação de formas, cores e tamanhos. São de extrema relevância para as florestas tropicais por sua distinta disposição de folhas em forma de rosetas que retém água da chuva e outros detritos que se tornam fonte de nutrientes tanto para elas quanto para micro- e macro-organismos (Benzing, 1970; Rocha et al., 1997; Goffredi et al., 2011). Essa característica também permite que diversas espécies animais possam utilizar a água contida nos seus tanques para forrageamento, reprodução e refúgio contra predadores (Rocha et al., 1997). As bromélias, na Mata Atlântica, também apresentam papel significativo na ciclagem e incorporação de nutrientes atmosféricos apesar de sua reduzida biomassa (Oliveira, 2004), e fornecem importantes habitats para micro-organismos envolvidos no ciclo biológico do carbono e nitrogênio em florestas tropicais (Goffredi et al., 2011).

Por serem plantas de apelo ornamental, muitas populações de espécies oriundas principalmente da Mata Atlântica, vem reduzindo drasticamente em tamanho, em decorrência do extrativismo ilegal (Coffani-Nunes, 2002). Apesar da crescente demanda na utilização de bromélias como plantas ornamentais, atualmente são poucos os produtores efetivos que atendem ao mercado consumidor (Bered, 2008).

Cerca de 40% das espécies de Bromeliaceae registradas na Mata Atlântica encontram-se sob alguma categoria de ameaça e é provável que este número esteja subestimado devido ao pouco conhecimento do real estado de conservação das populações em ambientes naturais (Martinelli et al., 2008). De fato, poucos trabalhos têm sido realizados para avaliar a diversidade genética de populações naturais dessa família, onde a maioria das espécies estudadas é endêmica da Mata Atlântica no sudeste do Brasil (Zanella et al., *in press*). Dos 58 gêneros, e por volta de 3.100 espécies de bromélias, somente 20 espécies dos seguintes gêneros já foram avaliados: *Aechmea*, *Alcantarea*, *Bromelia*, *Dyckia*, *Encholirium*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia*, e *Vriesea*. Muitas espécies estão atualmente distribuídas em biomas ameaçados, ou são endêmicas, ameaçando a sobrevivência de muitos membros dessa família. Ainda, percebe-se uma significativa redução na distribuição de espécies brasileiras em relação aos primeiros registros na literatura (Zanella et al., *in press*).

Considerações de reprodução clonal e sexual, demografia, estruturação genética dentro e entre populações, fluxo gênico, e sistemas de cruzamento de Bromeliaceae são de grande importância no desenvolvimento de estratégias de conservação (Bizoux & Mahy, 2007). Apesar disso, poucos trabalhos nesse grupo de fato relacionam os dados genéticos com planejamento de conservação e manejo (Zanella et al., *in press*).

1.3. O Gênero *Aechmea* e *Aechmea kertsziae* (Reitz)

O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav., com cerca de 240 espécies (Luther, 2008), 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 & Downs, 1979), e das 136 que ocorrem na Mata Atlântica 120 são endêmicas (Martinelli et al., 2008), sendo então a Mata Atlântica considerada o centro de diversidade para *Aechmea* assim como para a maioria dos gêneros da subfamília Bromelioideae (Smith, 1934) (Figura 1).

As espécies do subgênero *Ortgiesia* (*Aechmea*) são morfologicamente muito semelhantes ocorrendo sérios problemas de delimitação taxonômica no grupo. Fazem parte desse subgênero em torno de 20 espécies, sendo sete endêmicas de Santa Catarina e/ou do Rio Grande do Sul (Smith & Downs, 1979; Reitz, 1983). São plantas com alto apelo ornamental, entretanto pouco se conhece sobre aspectos básicos, como sistema de cruzamento, estrutura genética, padrões filogeográficos, fluxo gênico entre as

populações, fenologia e até mesmo dados sobre a distribuição geográfica das espécies são escassos.

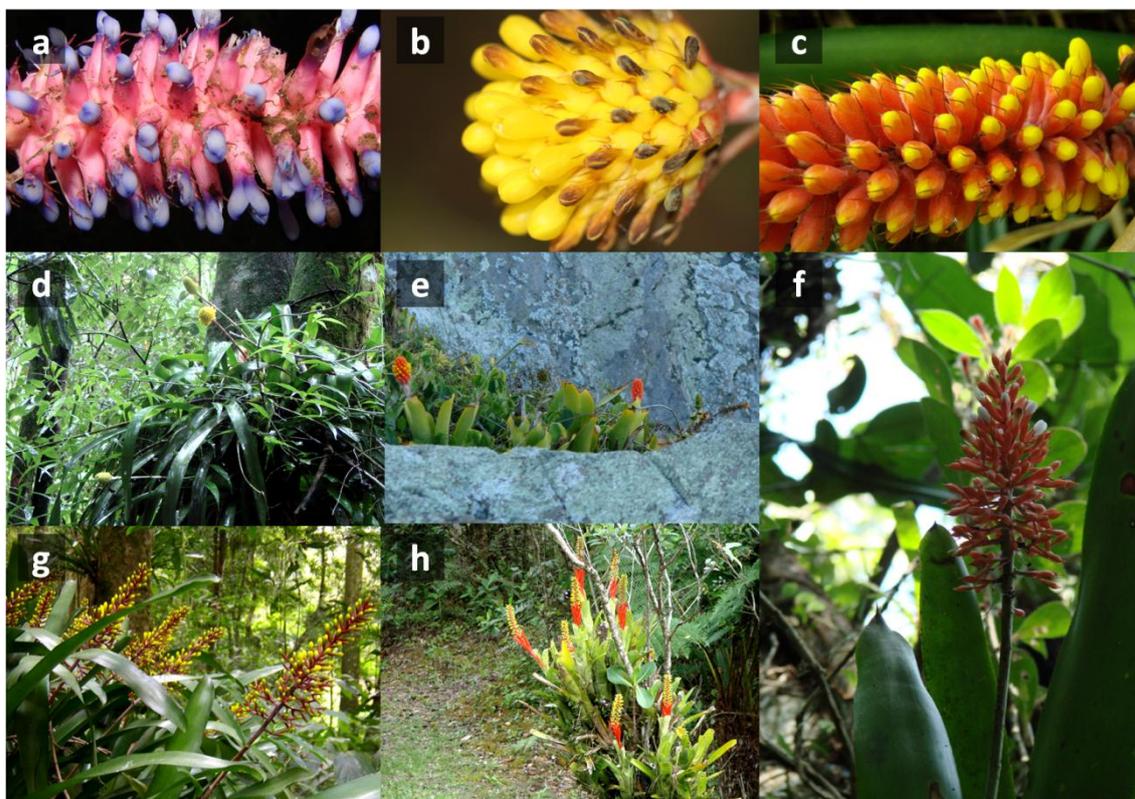


Figura 1. Exemplos de espécies do gênero *Aechmea*. a) inflorescência de *Aechmea cylindrata*; b) inflorescência de *Aechmea calyculata*; c) inflorescência de *Aechmea kertesziae*; d) *Aechmea calyculata*; e) *Aechmea comata*; f) *Aechmea organensis*; g) *Aechmea winkleri*; h) *Aechmea nudicaulis*.

Aechmea kertesziae (Figura 2) é característica e exclusiva da zona da floresta Pluvial Atlântica. É pouco exigente quanto à umidade do ar, ocorrendo principalmente na vegetação arbustiva da restinga como rupícula ou epífita. É uma planta sem caule, com presença de estolões, inflorescência simples, fruto do tipo baga, florescendo nos meses de abril, e de julho a novembro (Reitz, 1983). Atualmente existe discordância em relação à distribuição geográfica atual da espécie, segundo Reitz (1983) ela é endêmica do estado de Santa Catarina, mas alguns autores afirmam que a sua distribuição vai desde o Rio Grande do Sul até o Paraná (Martinelli et al., 2008; Forzza et al., 2012). Entretanto, a ausência de informação referente à localização dessas supostas populações, e também ausência de indivíduos referenciais (depositados em herbários), não nos permite confirmar se essas populações realmente se tratam da *A. kertesziae*. Miyamoto (2012), ao fazer um levantamento das espécies do gênero *Aechmea* no

Paraná, determinou que a *A. kertesziae* não ocorre nesse Estado, o que nos leva a acreditar que outras espécies tenham sido identificadas equivocadamente como *A. kertesziae*, especialmente em função da morfologia muito semelhante entre as espécies do grupo. Além disso, nas expedições a campo realizadas pelo nosso grupo de pesquisa (Núcleo Genética e Conservação de Plantas - NGCP), em busca de espécies do subgênero *Ortgiesia*, do Rio Grande do Sul ao Espírito Santo, a espécie não foi encontrada fora do Estado de Santa Catarina. Em função disso, a distribuição geográfica considerada foi a proposta por Reitz (1983), que seria desde o Vale do Itajaí até Laguna em Santa Catarina, onde apenas cinco pequenas populações são conhecidas.



Figura 2. *Aechmea kertesziae*; a) inflorescência e b) planta com inflorescência.

1.4. Objetivo

O trabalho tem como objetivo geral contribuir para os estudos genéticos e biológicos da família Bromeliaceae, principalmente de espécies do gênero *Aechmea*, endêmicas da região Sul da Mata Atlântica. A diversidade e estruturação genética de populações naturais de *A. kertesziae* foram abordados através da utilização de marcadores moleculares nucleares e plastídias. Tais informações serão de extrema relevância para a conservação e manutenção de *A. kertesziae* e espécie relacionadas.

2. ARTIGO

Padrões de diversidade genética da bromélia *Aechmea kertesziae*, uma espécie endêmica do Sul da Mata Atlântica

Artigo a ser submetido para *Journal of Heredity*

Padrões de diversidade genética da bromélia *Aechmea kertesziae*, uma espécie endêmica do Sul da Mata Atlântica

FERNANDA CAPRA¹, MÁRCIA GOETZE¹, MIRIAM V. BUTTOW¹, CAMILA M. ZANELLA¹,
FERNANDA BERED^{1,*}

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, CP 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

*E-mail para correspondência: fernanda.bered@ufrgs.br

Título Resumido: Diversidade genética na bromélia *Aechmea kertesziae*

Resumo

Estudos visando compreender os processos que levaram à diversificação das espécies na Mata Atlântica envolvem, principalmente, espécies de ampla distribuição geográfica, possivelmente deixando de discutir fatores relevantes para espécies de restrita distribuição. Esse estudo examinou a diversidade genética em *Aechmea kertesziae*, uma bromélia endêmica do sul da Mata Atlântica, utilizando marcadores nucleares e plastidiais. *A. kertesziae* apresentou altos índices de diversidade genética, tanto nuclear ($R_S=6,19$; $H_O=0,618$; $H_E=0,709$) como plastidial ($h=0,796$; $\pi=0,0029$ e 7 haplótipos). Uma estruturação genética moderada foi observada com marcadores nucleares, ($F_{ST}=0,091$), e a partir da rede de haplótipos, dois grupos (centro-norte e sul) foram identificados. Nenhuma redução ou expansão populacional foi detectada com os marcadores utilizados. Esses resultados demonstram que as populações de *A. kertesziae*

permaneceram estáveis ao longo do tempo, não tendo sofrido fragmentação devido às oscilações climáticas do Pleistoceno, resultado não esperado, uma vez que estudos anteriores com outras espécies encontraram expansão recente na porção sul da Mata Atlântica. A alta diversidade genética observada é importante para a manutenção da espécie em longo prazo, entretanto, estratégias de conservação precisam ser implementadas para evitar o aumento da diferenciação genética e conservar os altos índices de diversidade encontrados para *A. kertesziae*.

Palavras-chave: conservação, filogeografia, fluxo gênico, genética de populações, microssatélites, Bromeliaceae.

Introdução

É esperado pela teoria da genética de populações, que espécies endêmicas de distribuição geográfica restrita, com populações pequenas e isoladas, tenham índices de diversidade genética inferiores àsquelas de ampla distribuição geográfica e populações não isoladas (Frankham et al. 2003). Apesar disso, altos índices de diversidade genética vêm sendo relatados para várias espécies de plantas endêmicas (p. e., Ægisdóttir et al. 2009; Eliades et al. 2011; Gitzendanner e Soltis 2000). A diversidade genética em plantas é influenciada principalmente por características relacionadas ao modo de vida (p. e., Hamrick e Godt 1996; Nybom 2004; Thiel-Egenter et al. 2009), e também por eventos históricos, como as oscilações climáticas do Pleistoceno. Em geral, áreas que permaneceram estáveis durante o Pleistoceno são reconhecidas por abrigar maior diversidade genética e endemismo (Hewit 2000).

A Mata Atlântica (MA) é considerada um dos hotspots de biodiversidade mundiais, por abrigar, por exemplo, aproximadamente 20.000 espécies de plantas, sendo uma porção considerável da biodiversidade da América do Sul (Myers et al.

2000). Apesar disso, a América do Sul é o continente com o menor número de estudos filogeográficos sobre plantas terrestres (Beheregaray 2008), não sendo diferente para a MA. Os poucos estudos filogeográficos com plantas existentes para MA avaliaram principalmente espécies de ampla distribuição geográfica (p. e., Palma-Silva et al. 2009; Pinheiro et al. 2011; Turchetto-Zolet et al. 2012) limitando o entendimento do impacto dos eventos climáticos do Pleistoceno em espécies com uma distribuição geográfica mais restrita a porção Sul do bioma. Em todos esses trabalhos foi observada uma recente expansão demográfica nas populações do Sul e áreas mais ao norte parecem ter permanecido estáveis durante as oscilações climáticas do Pleistoceno. Estudos recentes de modelagem de nicho com espécies animais têm tentado encontrar os refúgios responsáveis por abrigar populações naturais durante os ciclos glaciais-interglaciais do Quaternário na MA (Amaro et al. 2012; Carnaval et al. 2009; Porto et al. 2012; Thomé et al. 2010). Porém, ainda não existe um consenso sobre as áreas de provável refúgio, sendo a principal discordância sobre a existência de refúgios mais ao sul da MA. Porto et al. (2012) sugerem que o poder dos modelos de refúgios para espécies restritas ao sul é mais fraco do que para espécies de distribuição geográfica mais ampla, ressaltando a importância dos estudos de espécies de distribuição restrita. Entretanto, espécies não associadas a áreas de florestas, como aquelas que ocorrem na restinga, por exemplo, podem apresentar padrões distintos dos descritos acima, não tendo sofrido reduções significativas na distribuição geográfica e tamanho populacional devido a fragmentação em refúgios durante a retração da MA (p. e., Behling 2002; King et al. 2009; Pinheiro et al. 2011).

Bromeliaceae é uma das famílias de maior riqueza e diversidade da MA, e de maior relevância, devido ao alto grau de endemismos e expressivo valor ecológico decorrente principalmente de sua interação com a fauna (Martinelli et al. 2008),

apresentando mais de 3.100 espécies, que sofreram uma extensa radiação adaptativa (Luther, 2008). Por serem, na grande maioria, plantas de apelo ornamental, muitas populações vem reduzindo drasticamente em tamanho, em decorrência do extrativismo ilegal (Coffani-Nunes 2002). Dentre as espécies de Bromeliaceae registradas na MA, cerca de 40% encontram-se sob alguma categoria de ameaça e é provável que este número esteja subestimado devido ao pouco conhecimento do real estado de conservação das populações em ambientes naturais (Martinelli et al. 2008). De fato, poucos trabalhos têm sido realizados para avaliar a diversidade genética de populações naturais dessa família, onde a maioria das espécies estudadas é endêmica do sudeste do Brasil (Zanella et al. 2012a).

Aechmea kertesziae é uma espécie do subgênero *Ortgiesia*, que apresenta um complexo de espécies, cujos limites taxonômicos não são bem delineados (Faria et al. 2004; Horres et al. 2007; Smith e Downs 1979). Ela é característica e exclusiva da zona da floresta Pluvial Atlântica (MA), onde apresenta restrita distribuição geográfica, encontrada desde o Vale do Itajaí até Laguna em Santa Catarina. É pouco exigente quanto à umidade do ar, ocorrendo principalmente na vegetação arbustiva da restinga como rupícola ou epífita (Reitz 1983). Atualmente apenas cinco pequenas populações dessa espécie são conhecidas.

Usando uma espécie de distribuição geográfica restrita ao sul da MA (*A. kertesziae*), visamos contribuir para um maior entendimento dos processos que atuaram na diversificação de espécies do subgênero *Ortgiesia* e da porção sul da MA como um todo. Especificamente, esse trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a diversidade e estruturação genética em populações naturais de *A. kertesziae*; (ii) determinar o sistema de cruzamento de *A. kertesziae* e discutir se ele pode estar influenciando os níveis de diversidade genética observados; (iii) verificar se as oscilações climáticas do

Quaternário afetaram a distribuição geográfica da espécie, e se sim, se é possível identificar algum refúgio; (iv) determinar a contribuição relativa do fluxo de pólen em relação às sementes para o fluxo gênico da espécie. Os resultados encontrados poderão auxiliar na elaboração de estratégias de conservação para a espécie *A. kertesziae*.

Materiais e Métodos

Área de estudo e amostragem

Um total de 108 indivíduos foi amostrado nas cinco populações atualmente conhecidas de *A. kertesziae* (Figura 1a e Tabela 1). Devido ao tamanho amostral da população de Camboriú (5), esses indivíduos foram incluídos somente nas análises com marcadores plastidiais. As populações de Itajaí e Florianópolis atualmente se encontram em Unidades de Conservação (UCs), enquanto as de Camboriú, Bombinhas e Laguna estão desprotegidas. Para evitar erros de identificação taxonômica e a amostragem de clones, somente indivíduos reprodutivos foram coletados a uma distância mínima de 5 metros. Uma folha de cada indivíduo foi coletada e armazenada em sílica gel para a desidratação e posteriormente o DNA total foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990).

Marcadores moleculares, genotipagem e sequenciamento

Nove marcadores nucleares de microsatélite (nrDNA) foram usados nesse estudo para caracterização da diversidade genética em *A. kertesziae*: quatro isolados de *A. caudata* (Ac01, Ac11, Ac25 e Ac55; dados não publicados), quatro isolados de *Ananas comosus* (Acom_71.3, Acom_78.4, Acom_82.8 e Acom_91.2; Wöhrmann e Weising, 2011) e um isolado para *Dyckia distachya* (Dd10; Zanella et al. 2012b). Todas as reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume de 10 µL

contendo: 10 ng de DNA, 1 x de tampão da enzima, 2,0 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP mix, 1 pmol de “primer forward”, 4 pmol de “primer reverse”, 0,4 pmol de “primer” M13 marcado com diferentes fluorescências (FAM, VIC, PET ou NED), e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Go Taq, Promega) e amplificadas em termociclador TC-412 (Techne, Burlington, New Jersey, USA) com as condições de amplificação conforme descrito por Palma-Silva et al. (2007). Os locos foram genotipados em um sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyzer Sequencer (Applied Biosystems) e comparados com tamanho molecular padrão LIZ (Applied Biosystems) usando o programa GeneMarker (SoftGenetics).

O espaçador intergênico *rpl32-trnL* (cpDNA), foi amplificado e sequenciado usando os "primers" descritos por Shaw et al. (2007). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 20 µL contendo: 10 ng de DNA, 1 x de tampão da enzima, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM dNTP mix, 5 pmol de “primer forward” e “reverse”, e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Go Taq, Promega). As reações de PCR foram realizadas em termociclador TC-412 e o programa de amplificação foi como segue: desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por um 1 min, 72°C por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram sequenciados usando um sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). As sequências foram alinhadas no programa MUSCLE (Edgar 2004), implementado no MEGA 5.05 (Tamura et al. 2011) e corrigidas manualmente quando necessário. Pesos iguais foram dados a todas as variações, e cada "indel" foi considerado como um único evento mutacional.

Análise dos dados

nrDNA: A diversidade genética das populações de *A. kertesziae* foi caracterizada usando o número de alelos (A), número de alelos privados (A_P), riqueza alélica (R_S), heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) e o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), utilizando os programas FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995) e MSA 4.00 (Dieringer e Schlötterer 2003). Os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada população foram identificados usando o GENEPOP ON THE WEB (Raymond e Rousset 1995).

A partição da diversidade genética dentro e entre as populações foi examinada pela análise de variância molecular (AMOVA) e o grau de diferenciação entre as populações foi estimado pelas medidas de F_{ST} par-a-par, no programa ARLEQUIN 3.1.1 (Excoffier et al. 2005) de acordo com Weir e Cockerham (1984).

Uma análise bayesiana de agrupamentos foi realizada com o programa STRUCTRE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) para atribuir indivíduos a agrupamentos genéticos (K). A proporção de associação em cada agrupamento foi calculada sem considerar as localidades amostradas. Para determinar o número de agrupamentos mais provável os dados foram condicionados a diferentes valores de K variando de 1 a 6. As análises foram efetuadas sob o modelo de mistura assumindo frequências alélicas independentes e usando um período de "burn-in" de 50.000, com a duração de corrida de 300.000, e 10 iterações por K . O método de Evanno et al. (2005), que é baseado numa medida pontual "ad hoc" de ΔK que avalia a taxa de mudança de segunda ordem da função de probabilidade relativo ao K , foi usado para determinar o melhor valor de K .

Reduções recentes no tamanho populacional foram testadas baseando-se no excesso de heterozigosidade relativo ao número de alelos usando o método de coalescência implementado no programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet e Luikart

1996). A análise foi realizada sob o “two-phase model” (TPM) e o “stepwise mutation model” (SMM), com 95% de contribuição de mutações passo a passo e 5% de contribuição de mutações de múltiplos passos, para qual a variância foi estabelecida em 12, como sugerido pelo manual do programa. A significância do excesso de heterozigotos foi testada usando “one-tailed Wilcoxon signed-rank test”, como recomendado por Piry et al. (1999), para amostras com menos de 20 locos polimórficos.

cpDNA: O relacionamento genealógico entre os haplótipos foi estimado pelo método "median-joining" (Bandelt et al. 1999) usando o programa NETWORK 4.6 (<http://www.fluxus-engineering.com>). As populações foram caracterizadas para os níveis de diversidade através do número de haplótipos detectados (NH), diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), calculados usando o programa ARLEQUIN e DNAsp 5.1 (Librado e Rozas 2009). A análise de variância molecular (AMOVA) foi usada para estimar a partição da diversidade genética dentro e entre as populações no programa ARLEQUIN de acordo com Weir e Cockerham (1984). E depois uma nova AMOVA foi realizada baseada nos resultados encontrados na network (ver o item Fluxo gênico por dispersão de pólen e semente).

Uma análise espacial de variância molecular (SAMOVA) foi calculada usando o programa SAMOVA (<http://web.unife.it/progetti/genetica/Isabelle/samova/html>) (Dupanloup et al. 2002) para identificar limites espaciais ao longo das cinco localidades. Cem “annealing processes” foram empregados para otimizar a distribuição das amostras em grupos (K variando de 2 a 4). O número ótimo de grupos foi selecionado de acordo com o mais alto valor de F_{CT} (diferenciação entre grupos). A hipótese de expansão populacional foi testada pelos testes de neutralidade D de Tajima (1989) e F_S de Fu (1997) usando o programa ARLEQUIN.

Fluxo gênico por dispersão de pólen e semente

A contribuição relativa do pólen *versus* fluxo de semente para o fluxo gênico total foi estimada de acordo com a fórmula de Ennos (1994):

Fluxo de pólen / fluxo de semente =

$$\left[\left(\frac{1}{F_{STb}} - 1 \right) - \left(\frac{1}{F_{STm}} - 1 \right) \right] / \left(\frac{1}{F_{STm}} - 1 \right)$$

Onde F_{STb} e F_{STm} são os níveis de diferenciação populacional calculado para marcadores herdados biparentalmente (nrDNA) e maternalmente (cpDNA) respectivamente. Esse cálculo foi baseado no pressuposto da herança maternal de cpDNA em *A. kertesziae* como é na maioria das angiospermas (Ennos et al. 1999).

Esse modelo pode ser inapropriado de aplicar se as populações amostradas compreendem diferentes unidades evolutivas com pouco ou nenhum fluxo gênico entre elas (Zhai et al. 2012). Como essa situação provavelmente se aplica a *A. kertesziae* (ver Resultados), os cálculos foram feitos com o índice F_{STm} incluindo a população LA e excluindo LA.

Sistema de cruzamento

Os experimentos de sistema de cruzamento foram realizados *in situ*, na população de Florianópolis (FL) por ser a maior população de *A. kertesziae* e por ocorrer em uma UC. Os experimentos requerem que as plantas sejam marcadas e os frutos precisam ser coletados seis meses após os cruzamentos terem sido realizados, o que torna o experimento de difícil execução em áreas não protegidas e de fácil acesso. Cinco tratamentos foram aplicados: (1) polinização cruzada manual: flores emasculadas foram polinizadas com uma mistura de pólen coletado de plantas distintas e ensacadas; (2) polinização aberta (controle): as flores foram marcadas e não manipuladas; (3) auto-polinização manual: as flores foram polinizadas com seu próprio pólen e ensacadas; (4)

auto-polinização espontânea: as flores foram ensacadas para evitar a visitação de insetos; e (5) agamospermia: flores emasculadas foram ensacadas. Após seis meses, os frutos dos tratamentos foram coletados e a produção de frutos e sementes por fruto foi avaliada. Os tratamentos que produziram frutos foram comparados usando o teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$). O número de flores usadas por tratamento está na Tabela 2.

Resultados

Diversidade e estruturação genética nuclear

As quatro populações amostradas de *A. kertesziae* mostraram altos índices de diversidade genética para os nove marcadores de microssatélite utilizados (Tabela 3). O número de alelos por população variou de 57 a 73 e a riqueza alélica de 5,64 a 7,22. Os valores de heterozigosidade observada e esperada variaram de 0,550 a 0,691 e de 0,661 a 0,746, respectivamente. Dois a oito alelos privados foram encontrados em todas as populações. As quatro populações desviaram significativamente do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, mostrando excesso de homozigotos, com o coeficiente de endocruzamento variando de 0,075 a 0,221 (Tabela 3). A população com os maiores índices de diversidade (R_S e H_O) foi LA, seguida de FL e IT e por último BO.

Moderada estruturação genética foi observada entre as populações, indicada por um valor de F_{ST} de 0,091, demonstrando que 90,85% da variação é encontrada dentro das populações ($P < 0,001$; Tabela 4). Os valores de divergência genética entre as populações (F_{ST} par a par) variaram de 0,070 a 0,112 sendo todos estatisticamente significativos ($P < 0,001$; Tabela).

A análise bayesiana do STRUCTURE revelou como os dois mais prováveis números de agrupamentos, $K = 2$ e $K = 4$ (Figura 2), com as probabilidades atribuídas de cada indivíduo indicadas na Figura 3 para os dois valores. Para um $K = 2$, a maioria

dos indivíduos das populações de LA e FL formou um grupo genético, enquanto outro grupo genético foi formado pelos indivíduos de BO e IT. Para $K = 4$ observou-se um grupo genético principal para cada população. Alguns indivíduos mostraram probabilidades muito altas de pertencerem a um grupo que não é o representado pela sua localidade, o que provavelmente pode ser atribuído a migrantes entre elas (Figura 3).

Não foi encontrado aumento significativo de heterozigosidade nos testes de Wilcoxon (Bottleneck), de acordo com os modelos TPM e SMM, indicando que as populações não passaram por um recente ou forte evento de gargalo de garrafa.

Diversidade e estruturação genética plastidial

A amplificação do espaçador intergênico *rpl32-trnL* resultou em um fragmento de 876 pb com oito sítios variáveis e com 26,5% conteúdo de CG. Sete haplótipos foram observados nas populações de *A. kertesziae*, com dois a três por população (Tabela 3).

A análise de relacionamento haplotípico resultou em uma rede de haplótipos bem resolvida, podendo ser dividida entre os haplótipos que ocorrem nas populações do centro ao norte da distribuição geográfica da espécie (FL, BO, CA, IT) e os haplótipos que ocorrem no sul, na população LA (Figura 1). Esses dois grupos estão separados por cinco passos mutacionais (Figura 1b). O haplótipo H2 foi o mais frequente ocorrendo em 15 indivíduos em três populações, seguido pelo H3 que ocorreu em 13 indivíduos também em três populações. O haplótipo H7 foi o terceiro mais frequente sendo registrado em cinco indivíduos, mas todos pertencentes a população LA. Todos os outros haplótipos tiveram a mesma frequência (três indivíduos) aparecendo em diferentes populações. Com exceção de CA, todas as populações apresentaram um a

dois haplótipos exclusivos, sendo LA a única que não compartilha haplótipos com as outras (Figura 1b).

A diversidade haplotípica variou de 0,3429 até 0,7500 e a nucleotídica de 0,0004 a 0,0012 (Tabela 3). As diversidades haplotípica e nucleotídica totais foram de 0,7960 e 0,0029, respectivamente. A população com os maiores índices de diversidade foi BO seguida por FL, LA depois CA e por fim IT, com os menores índices.

A análise de AMOVA revelou que 82,22% da variação genética ocorreu por diferenças entre as populações ($P < 0,001$; Tabela 4) indicando uma estruturação genética muito alta ($F_{ST} = 0,822$). A análise espacial de variância molecular (SAMOVA) não encontrou formação de grupos ou barreiras ao fluxo gênico para nenhum dos valores de K testados ($F_{CT} = 0,819$ para dois grupos; $P > 0,208$, dados não mostrados). Apesar disso uma nova AMOVA foi realizada baseada nos resultados da network de relacionamento de haplótipos, excluindo a população de LA (que ficou isolada das demais por cinco passos mutacionais; Figura 1b). Essa nova análise indicou que 51,09% da variação é devido a diferenças entre as populações ($F_{ST} = 0,510$; $P < 0,001$; Tabela 4).

Não houve significância nos testes de neutralidade D de Tajima e F_S Fu para as populações, indicando que todas elas se mantiveram estáveis ao longo do tempo.

Fluxo de pólen versus semente

Usando os valores de F_{ST} da análise de variância molecular entre as populações para marcadores nucleares (0,09) e plastidial (0,82) a taxa de fluxo de pólen em relação ao fluxo de semente foi estimada em 44,06. Um novo valor foi estimado usando o F_{STm} que excluiu a população LA, pois é possível que a estruturação extremamente alta esteja desviando essa estimativa. Com esse novo F_{STm} (0,51) obtivemos uma taxa de fluxo de

pólen/semente de 8,52, sugerindo que o fluxo gênico via pólen em *A. kertesziae* seja pelo menos 8,52 vezes mais eficiente do que via semente.

Sistema de cruzamento

O resultado dos cruzamentos manuais realizados indicaram que *A. kertesziae* é uma espécie auto-incompatível. Dos cinco tratamentos realizados apenas o de polinização aberta (PA) e polinização cruzada manual (PCM) apresentaram produção de sementes, ocorrendo diferença estatística entre eles (Tabela 2).

Discussão

Espécies que apresentam restrita distribuição geográfica, com poucas e pequenas populações e que ocorrem em ambientes fragmentados, requerem atenção devido à maior probabilidade de extinção em função da ação da deriva genética e cruzamento entre aparentados (Frankham et al. 2003). *Aechmea kertesziae* é uma espécie que apresenta populações pequenas e em reduzido número (apenas cinco), dessa forma hipotetizou-se que a espécie apresentaria baixos índices de diversidade genética e alto coeficiente de endocruzamento como proposto por Frankham et al (2003).

Apesar disso, a espécie apresentou altos índices de diversidade genética (Tabela 3), substancialmente mais altos do que aqueles encontrados em outras espécies de bromélias, tanto auto-compatíveis (Palma-Silva et al. 2009; Zanella et al. 2011), quanto auto-incompatíveis (Goetze 2010), utilizando microssatélites nucleares. A investigação do sistema de cruzamento de *A. kertesziae* revelou que essa é uma espécie auto-incompatível (Tabela 2), o que pode explicar os altos índices de diversidade observados (Glémin et al. 2006). Desta forma, o excesso de homozigotos identificado nas

populações (Tabela 3), deve se dar devido ao cruzamento de indivíduos aparentados e não por auto-fecundação.

A população de BO apresentou os menores índices de diversidade genética, provavelmente por ser a população mais afetada pelo desenvolvimento urbano do litoral. Essa população ocorre em uma trilha entre praias e casas, largamente utilizada pelos veranistas. Em contrapartida, a população LA, localizada numa região quase sem interferência antrópica, apresentou a maior riqueza alélica ($R_S = 7,22$), demonstrando a provável influência da atividade humana na diversidade genética das populações naturais. Porém, quando avaliado o número de alelos (A) e alelos privados (A_P), a população de BO é mais diversa que IT e FL, questionando a influência antrópica na diversidade genética de *A. kertesziae*.

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura sobre diversidade plastidial para espécies de bromélias. Além disso, é amplamente reconhecido que pouca ou nenhuma variação ocorre no genoma de cloroplasto para Bromeliaceae (p. e., Maia et al. 2012). Apesar disso, a diversidade haplotípica e nucleotídica observada para *A. kertesziae* (Tabela 2) pode ser considerada alta, quando comparada a outras bromélias do mesmo subgênero, usando a mesma região plastidial, que variaram de 0,000 a 0,762 para a diversidade haplotípica total, e de 0,0000 a 0,0025 para a nucleotídica total (Goetze, dados não publicados). Além disso, quatro das cinco populações de *A. kertesziae* apresentaram haplótipos exclusivos (LA, FL, BO e IT; Figura 1a).

A maior diversidade nuclear foi encontrada na população de Laguna, enquanto a maior diversidade plastidial foi em Bombinhas, e nenhuma delas se encontra protegida por Unidades de Conservação. Laguna ainda apresenta dois haplótipos exclusivos, o maior número de alelos, seguida por Bombinhas, e as duas apresentam oito alelos privados cada uma (Figura 1a; Tabela 3). Esses dados ressaltam a importância dessas

populações na manutenção da diversidade da espécie, sendo estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* de particular importância. Primeiramente recomendamos que as populações de BO e LA sejam protegidas *in situ*, por lei, para prevenir possíveis decréscimos no tamanho populacional. Em relação a medidas de conservação *ex situ*, a coleta de sementes, tecidos para cultura e alguns ramets de cada população conhecida seriam úteis para o sucesso de qualquer ação conservacionista.

Foi observada uma estruturação genética moderada entre as populações de *A. kertesziae* ($F_{ST} = 0,091$) para marcadores nucleares, o que concorda com o $K = 2$ grupos genéticos encontrado com a análise Bayesiana (Figura 3). Entretanto, levando em consideração os valores de diferenciação genética observado nas análises par a par das populações (Tabela 5), ou seja, valores similares de estruturação entre si, um $K = 4$ também não pode ser descartado (Figura 3). Porém, vários indivíduos migrantes foram observados, tanto com $K = 2$ como com $K = 4$ (Figura 3), demonstrando ocorrer fluxo gênico entre as populações, sendo esse resultado consistente com os valores moderados de estruturação genética. O que pode estar contribuindo para que haja essa estruturação moderada é o aumento da fragmentação de hábitat, provavelmente associado à expansão do litoral que, há cerca de pouco mais de duas décadas, vem sofrendo forte descaracterização das formações vegetais próximas à praia, principalmente pela crescente expansão de ocupações urbanas, com adensamento populacional e impactos ambientais (Brack 2006).

A estruturação genética moderada entre as populações, a ausência de gargalo de garrafa recente, aliado aos altos índices de diversidade genética encontrados para *A. kertesziae* sugerem que as populações tenham sido fundadas por indivíduos geneticamente diversos, sendo que a maior parte dessa diversidade foi mantida ao longo das oscilações climáticas do Quaternário, e que as populações foram grandes o

suficiente no passado para limitar a perda de alelos por deriva genética. Outros fatores que indicam a estabilidade da espécie ao longo do tempo são os testes de neutralidade D de Tajima e F_S de Fu que não identificaram sinais de redução ou expansão populacional, e a presença de haplótipos exclusivos em algumas populações (Figura 1a) sugerindo a permanência das mesmas em longo prazo na região, e não recolonizações a partir de populações adjacentes.

Esses resultados sugerem que *A. kertesziae* não foi fortemente afetada pelas oscilações climáticas do Pleistoceno, sugerindo que uma proporção significativa da espécie não teve a distribuição geográfica fragmentada em refúgios durante o último máximo glacial. A grande maioria das espécies do subgênero *Ortgiesia* é epífita, associadas a espécies arbóreas da Mata Atlântica. Entretanto, *A. kertesziae* é um espécie saxícola, encontrada somente na região costeira do estado de Santa Catarina, podendo ser considerada uma espécie não florestal. Isso poderia explicar esse padrão encontrado. Outros trabalhos com espécies costeiras encontraram resultados similares, indicando estabilidade em relação às oscilações climáticas do Pleistoceno (King et al. 2009; Pinheiro et al. 2011). Entretanto, para a espécie *Vriesea gigantea*, endêmica da Mata Atlântica e associada à floresta, foi observado um padrão distinto, com evidências de fragmentação no passado devido a contração da floresta em função do clima frio e seco durante o Pleistoceno (Palma-Silva et al. 2009). Porém, precisa ser levado em consideração que no presente trabalho somente uma região de cpDNA foi analisada e que para a confirmação dos resultados encontrados seria necessário a utilização de mais marcadores.

As análises realizadas pelo SAMOVA com cpDNA, não encontraram barreiras ao fluxo gênico (veja resultados). Entretanto, a análise de variância molecular identificou que 82,2 % da variação no cpDNA é devido a diferenças entre as populações

(Tabela 4), ou seja, indicando alta estruturação genética. Além disso, a rede de haplótipos mostra dois grupos, centro-norte e sul (Figura 1), separados por cinco passos mutacionais. Quando a população de Laguna foi retirada das análises de AMOVA, o percentual de variação foi reduzido para 0,51, indicando que essa população pode ser responsável pelos altos valores de estruturação genética observados. O fato da SAMOVA não ter encontrado barreiras ao fluxo gênico, pode ser um artefato da análise, pelo fato de somente uma região plastidial ter sido incluída nas análises até o momento. Essa provável separação da população de Laguna das demais, pode ser devido as transgressões marinhas que ocorreram durante o Holoceno, e que ocasionaram a formação de diversos complexos "ilha-lagoa" ao longo da costa de Santa Catarina (Caruso 2000), isolando a população. Pinheiro et al. (2011) também relataram influências das transgressões marinhas do Holoceno para uma espécie de orquídea característica de restinga no litoral brasileiro, observando valores distintos de diversidade genética para as populações dessa região.

O fluxo gênico via pólen mostrou-se cerca de 44 vezes maior do que via semente para as populações de *A. kertesziae*. Entretanto, utilizando para esse cálculo os valores da AMOVA obtidos retirando-se a população de Laguna das análises, o fluxo via pólen foi 8,5 vezes maior do que via sementes. Petit et al. (2005) determinaram que a média da taxa de fluxo gênico entre plantas com semente é de fluxo gênico via pólen 17 vezes maior que via semente, mostrando que o fluxo gênico via pólen é muito mais significativo em geral. Porém, o autor reporta ainda que 27% dessas plantas apresentam taxas abaixo de cinco, indicando uma representação significativa da semente no fluxo gênico total (20% do total, característica de plantas polinizadas por insetos e com frutos carnosos dispersos por vertebrados). *A. kertesziae* é de fato polinizada por insetos (Buttow, dados não publicados) e suas sementes são dispersas por aves. Pelo fato da

dispersão das sementes ser realizada por animais, acredita-se que o fluxo gênico cerca de oito vezes maior via pólen seja um valor mais confiável para a espécie. Os resultados mostram que os polinizadores de *A. kertesziae* desempenham um papel importante na manutenção da conectividade genética das populações, mas não podendo ser descartado a ação dos dispersores. Esse padrão pode ser observado no resultado da análise Bayesiana (Figura 3) onde pode ser identificado a presença de vários indivíduos migrantes, provavelmente oriundos de eventos de dispersão de sementes. Sendo assim, a interação entre esses organismos e a *A. kertesziae* não pode ser rompida, em especial por se tratar de uma espécie auto-incompatível.

CONCLUSÕES

Observando os resultados obtidos para *A. kertesziae* podemos concluir que apesar de ter somente cinco pequenas populações conhecidas, elas ainda conservam altos níveis de diversidade genética. O fato de ser uma espécie auto-incompatível provavelmente contribui com a manutenção dessa diversidade. Já os níveis moderados de estruturação atual e a ausência de gargalos de garrafa contribuem para a hipótese de que as populações foram fundadas por indivíduos geneticamente diversos e que foram capazes de manter a diversidade ao longo do tempo. Os nossos resultados determinaram que a espécie não ficou restrita a áreas de refúgio durante o Último Máximo Glacial, muito provavelmente porque *A. kertesziae* é saxícola, restrita a região costeira que deve ter permanecido estável durante as oscilações climáticas. Os eventos de transgressão marinha durante o Holoceno possivelmente afetaram o fluxo gênico entre as populações de *A. kertesziae* no passado, resultando no isolamento da população de Laguna das demais por cinco passos mutacionais. O fluxo gênico via pólen é cerca de oito vezes maior do que via semente, mostrando um importante papel dos polinizadores em manter

a conectividade genética das populações, mas não podendo ser descartada a ação dos dispersores de semente que provavelmente também contribuam de forma significativa.

Apesar da espécie ainda ter considerável diversidade genética, o desenvolvimento do litoral põe em risco sua permanência no ambiente, já que as duas populações que abrigam a maior diversidade não estão protegidas em UCs e a antropização local demonstra estar aumentando o cruzamento entre indivíduos aparentados, como observado na população de BO, levando a uma diminuição da diversidade genética. Dessa forma, seria de grande importância para a manutenção da espécie, o monitoramento e a conservação das duas populações (BO e LA) que estão fora de UC, principalmente por possibilitar a manutenção do fluxo gênico entre elas. No entanto, apesar da notável influência da fragmentação e do impacto humano na distribuição da diversidade atual em populações naturais, os eventos históricos tem se mostrado de grande importância para a distribuição dessa diversidade nas espécies.

O estudo de espécies de distribuição geográfica restrita, principalmente aquelas que ocorrem no Sul da Mata Atlântica é importante por aumentar o conhecimento dos processos e eventos que moldaram a distribuição da diversidade genética, contribuindo para um maior entendimento a cerca da evolução do bioma como um todo.

Financiamento

Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradecimentos

Os autores agradecem Christian R. Rohr, Rafael V. Boas e Silvanio, guarda parque da Unidade de Conservação Desterro em Florianópolis, pela ajuda na coleta das amostras; ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela permissão de coleta.

Referências

- Ægisdóttir HH, Kuss P, Stöcklin J. 2009. Isolated populations of a rare alpine plant show high genetic diversity and considerable population differentiation. *Ann Bot.* 104:1313-1322.
- Amaro RC, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y, Carnaval AC. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Mol Phylogen Evol.* 62:880-888.
- Bandelt HJ, Forster P, Roehl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 37-48.
- Beheregary LB. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol*: doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03857.x
- Behling H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 177:19-27.
- Brack P. 2006. Vegetação e Paisagem do Litoral Norte do Rio Grande do Sul: patrimônio desconhecido e ameaçado. *In* Resumos do II ESALN- Encontro Socioambiental do Litoral Norte do RS: ecossistemas e sustentabilidade. p. 46-71.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323:785-789.

- Caruso F, Suguio K, Nakamura T. 2000. The Quaternary Geological History of the Santa Catarina, Southeastern Region Brazil..An. Acad. Bras. Ci., 72 2.
- 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.
- Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144:2001-2014.
- Dieringer D, Schlotterer C. 2003. Microsatellite Analyser MSA: a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3:167-169.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11:2571-2581.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1794-1797.
- Eliades NGH, Gailing O, Leinemann L, Fady B, Finkeldey R. 2011. High genetic diversity and significant population structure in *Cedrus brevifolia* Henry, a narrow endemic Mediterranean tree from Cyprus. *Plant Syst. Evol.* 294:185-198.
- Ennos RA. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *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 plant populations. In: Hollingworth PM, Bateman RM, Gornall RJ eds. *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis: London, pp 1-19.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulations study. *Mol Ecol*, 14:2611-2620.

- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.
- Faria APG, Wendt T, Brown GK. 2004. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Ann Mo Bot Gard* 91:303-319.
- Felsenstein J. 2004. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, Version 3.69. <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2003. Introduction to conservation genetics. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, 617 pp.
- Fu YX, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.
- Gitzendanner MA, Soltis PS. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot.* 87:783-792.
- Glémin S, Bazin E, Charlesworth D. 2006. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proc. R. Soc. B* 273:3011-3019.
- Goetze M. 2010. Filogeografia e diversidade genética de *Aechmea caudata* Lindm.. e *A. winkleri* Reitz. Bromeliaeaceae.: implicações taxonômicas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 89 pp.
- Goudet J. 1995. FSTAT Version 1.2.: A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485-486.
- Leme EMC, Marigo LC. 1993. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro, 183 pp.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos T Roy Soc B.* 351:1291–1298.

- Hewitt GM. 1996. Some genetics consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of Linnean Society*, 58:247-276.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405:907-913
- Horres R, Schulte K, Weising K, Zizka G. 2007. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) – evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso* 23:27–43.
- King MG, Horning ME, Roalson EH. 2009. Range persistence during the last glacial maximum: *Carex macrocephala* was not restricted to glacial refugia. *Mol Ecol*, 18:4256-4269.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Luther HE. 2008. An Alphabetical List of Bromeliad Binomials, 11th ed. Bromeliad Society International, Sarasota, Florida. p. 114.
- Maia VH, Mata CS, Franco LO, Cardoso MA, Cardoso SRS, Hemerly AS, Ferreira PCG. 2012. DNA Barcoding Bromeliaceae: Achievements and Pitfalls. *PloS ONE* 7(1): e29877.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa A, Forzza RC. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*. 59:209-258.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol*. 13:1143-1155.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbara T, Lexer C, Gimenes A, Bered F, 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, 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.
- Petit RJ, Duminil J, Fieschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol Ecol* 14:689-701.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *J Biogeogr*: 38:1923-1935.
- Porto JT, Carnaval AC, Rocha PLB. 2012. Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. *Diversity and Distributions*: 1-11.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR, 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.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Reitz R. 1983. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense* Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 808 pp.

- Smith LB, Downs RJ. 1979. Bromelioideae (Bromelioideae). Flora Neotropica Monografia 14: 1443-2142.
- Tajima F. 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thiel-Egenter C, Gugerli F, Alvarez N, Brodbeck S, Cieślak E, Colli L, Englisch T, Gaudeul M, Gielly L, Korbecka G, et al. 2009. Effects of species traits on the genetic diversity of high-mountain plants: a multi-species study across the Alps and the Carpathians. *Global Ecol Biogeogr.* 18:78-87.
- Thomé MT, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera FA, Alexandrino J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Phylogen Evol.* 55:1018-1031.
- Turchetto-Zolet AC, Cruz F, Vendramin GG, Simon MF, Salgueiro F, Margis-Pinheiro M, Margis R. 2012. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65:174-182.
- Vallejo-Marín M, O'Brien HE. 2007. Correlated evolution of self-incompatibility and clonal reproduction in *Solanum* (Solanaceae). *The New Phytologist*, 1732:415-421.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.

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

Zanella CM, Janje A, Palma-Silva C, Katchuck-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Buttow, MV, Bered F. 2012a. Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genet Mol Biol*, 35:1020-1026.

Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis, MS, Bered F. 2012b. Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in others bromeliads. *International Journal of Molecular Science* 13:15859:15866.

Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F. 2011. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 989:1511-1519.

Zhai SN, Comes HP, Nakamura K, Yan HF, Qiu YX, 2012. Late Pleistocene lineage divergence among populations of *Neolitsea serica* (Lauraceae) across a deep sea-barrier in the Ryukyu Islands. *Jornal of Biogeography* 39:1347-1360.

Tabela 1 Populações amostradas com seu código (ID), coordenadas geográficas e tamanho amostral, para marcadores nucleares e plastidiais de *Aechmea kertesziae* no sul do Brasil.

População	ID	Latitude S	Longitude W	Tamanho amostral	
				Nuclear	Cloroplasto
Itajaí	IT	26°55.447'	48°38.131'	22	15
Camboriú	CA	27°00.055'	48°34.592'	-	5
Bombinhas	BO	28°30.428'	48°45.266'	36	8
Florianópolis	FL	27°31.745'	48°30.617'	20	8
Laguna	LA	27°08.731'	48°29.957'	25	8
Total				103	44

Tabela 2 Experimento de sistema de cruzamento em *Aechmea kertesziae*: produção de sementes de acordo com os tratamentos: polinização aberta (controle) (PA), polinização cruzada manual (PCM), auto-polinização manual (APM), auto-polinização espontânea (APE) e apomixia (agamosperma) (AG).

Tratamento	Número de flores usadas por tratamento	Frutos com produção de sementes		Produção de sementes (média ± erro padrão)
		n	%	
PA	37	29	78,38	61,19 ± 11,52 a
PCM	19	11	57,89	98,68 ± 24,47 b
APM	18	0	0	0
APE	15	0	0	0
AG	12	0	0	0

Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças estatísticas para o teste χ^2 ($\alpha = 0,05$). CHI-SQUARE = 66,89, d.f. = 36, $P = 0,001$.

Tabela 3 Diversidade genética nuclear e plastidial nas populações de *Aechmea kertesziae* incluindo número de alelos (A), alelos privados (A_p), riqueza alélica (R_s), heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), número de haplótipos (NH), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π).

ID	nrDNA						cpDNA		
	A	A_p	R_s	H_o	H_e	F_{IS}	NH	h	π
IT	57	2	5,91	0,592	0,702	0,191**	2	0,3429	0,0004
CA	-	-	-	-	-	-	2	0,4000	0,0005
BO	61	8	5,64	0,550	0,661	0,221**	3	0,7500	0,0012
FL	57	3	5,97	0,639	0,728	0,131**	2	0,5357	0,0006
LA	73	8	7,22	0,691	0,746	0,075**	2	0,5357	0,0006

** Valores estatisticamente significativos para $P < 0,001$, indicando que as populações não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4 Análise da variância molecular (AMOVA) para dados de marcadores microsatélites nucleares (nrDNA) e região *rpl32* plastidial (cpDNA).

Fonte de variação	g.l.	Componentes da Variância	Porcentagem da variação	F_{ST}	Valor-P
<i>nrDNA</i>					
Entre as populações	3	0,142	9,15	0,091	$P < 0,001$
Dentro das populações	202	1,416	90,85		$P < 0,001$

cpDNA com LA					
Entre as populações	4	1,269	82,22	0,822	$P < 0,001$
Dentro das populações	39	0,274	17,78		$P < 0,001$
cpDNA sem LA					
Entre as populações	3	0,288	51,10	0,510	$P < 0,001$
Dentro das populações	32	0,275	48,90		$P < 0,001$

Tabela 5 Divergência genética (FST) par a par para as populações de *Aechmea kertesziae*.

	LA	FL	IT
FL	0,100		
IT	0,112	0,090	
BO	0,082	0,103	0,070

Todos os valores foram estatisticamente significativos para $P < 0,001$.

Figura 3 Mapa mostrando a distribuição atual da *Aechmea kertesziae* no litoral do Estado de Santa Catarina (SC), Brasil, incluindo populações amostradas e relacionamento dos sete haplótipos encontrados. (a) Localização geográfica da área de estudo e proporção da ocorrência de cada haplótipo nas populações amostradas. (b) Rede dos haplótipos encontrados. Os haplótipos estão identificados por números e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos mesmos. O número de mutações necessário para explicar as transições entre haplótipos está indicado pelo número de barras de um haplótipo para outro.

Figura 2 Magnitude de ΔK da análise de estruturação como uma função de K (média \pm d.p. das dez interações), calculado de acordo com o método proposto por Evanno et al. (2005) para os dados de microssatélites em *Aechmea kertesziae*. O valor modal da distribuição indica o verdadeiro K ou o maior nível de estruturação, aqui dois "grupos genéticos".

Figura 3 Estruturação das populações em *Aechmea kertesziae* no litoral de Santa Catarina usando a análise bayesiana de agrupamentos para o modelo populacional de $K = 2$ (em cima) e $K = 4$ (abaixo). Ver Tabela 1 para a identificação das populações.

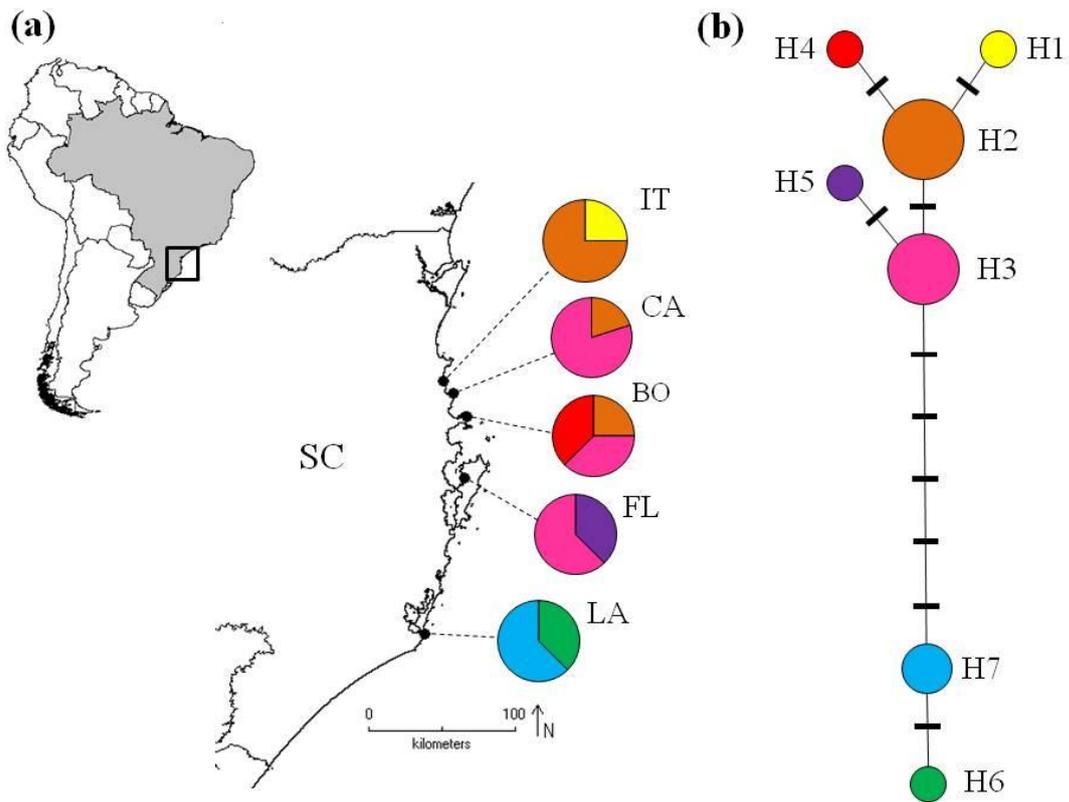


Figura 4

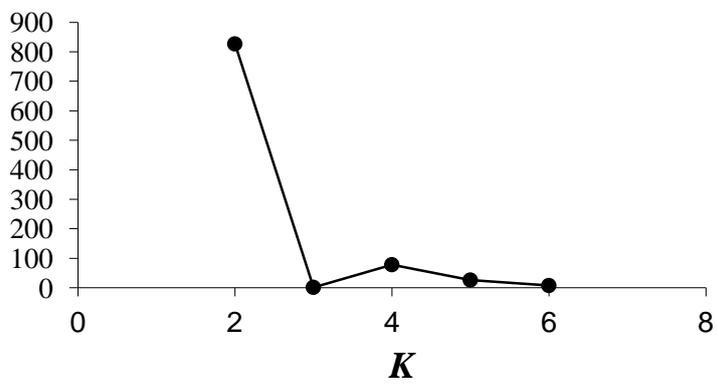


Figura 2

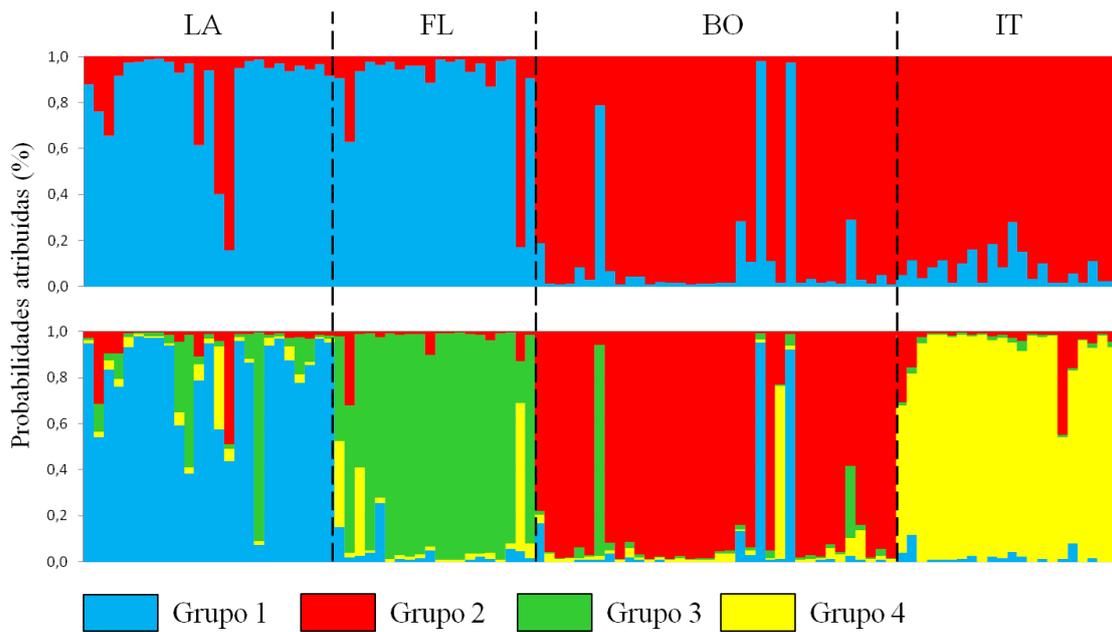


Figura 3

3. PERSPECTIVAS

Para maior suporte dos resultados encontrados, mais uma região de cpDNA, *rpS16-trnK*, será sequenciada e incluída nas análises.

4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- Barbieri RL (2003) Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: Freitas LB e Bered F (org.) Genética e Evolução Vegetal. Ed. da UFRGS, Porto Alegre, pp 403-414.
- Benzing DH (1970) Foliar permeability and the absorption of minerals and organic nitrogen by certain tank bromeliads. Bot Gaz 131: 23–31.
- Benzing, DH (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 690 pp.
- Bered F, Kaltchuk-Santos E, Palma-Silva C, 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 - DF, pp. 235-251.
- Bermingham E, Moritz C (1998) Comparative phylogeography: concepts and applications. Mol Ecol 7: 367-369.
- Bizoux JP, Mahy G (2007) Within-population genetic structure and clonal diversity of a threatened endemic metallophyte, *Viola calaminaria* (Violaceae). Am J Bot 94: 887-895.
- Coffani-Nunes JV (2002) Bromélias. In: Simões LL e Lino CF (Org.) Sustentável Mata Atlântica – A exploração de recursos vegetais. Editora Senac, São Paulo, pp 119-132.
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, 2012. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do

Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
(<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB005823>).

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2003) Introduction to conservation genetics. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, 617 pp.

Frankham R, Ballou JD, DA Briscoe (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Editora SBG, Ribeirão Preto, SP.

Gitzendanner MA, Weekley CW, Germain-Aubrey CC, Soltis DE, Soltis PS (2012) Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. *Conserv Genet* 13: 223–234.

Givnish, T J, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC et al (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98(5): 872-895.

Goffredi SK, Kantor AH, Woodside WT (2011) Aquatic microbial habitats within a Neotropical Rainforest: bromeliads and pH-associated trends in bacterial diversity and composition, *Environ Microbiol* 61: 529–542.

Leme EMC, Marigo LC (1993) Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro, 183 pp.

Luther HE (2008). An Alphabetical List of Bromeliad Binomials, 11th ed. Bromeliad Society International, Sarasota, Florida. p. 114.

Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa A, Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59 (1): 209-258.

Miyamoto SNA, Tardivo RC (2012). O GÊNERO *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL. Em trabalhos: Sistemática e Taxonomia. 63º Congresso Nacional de Botânica, Botânica em frente às mudanças globais. Joinville, SC, Brasil.

- Medina E. (1990) Eco-fisiologia y evolución de las Bromeliaceae. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias 59: 71-100.
- Nei M, Maruyama T, Charaborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1–10.
- Oliveira RR (2004) Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica, *Acta Bot Bras* 18(4): 793-799.
- Reitz R (1983) Bromeliáceas e a Malária-Bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense Herbário Barbosa Rodrigues*, Itajaí, 808 pp.
- Rocha CFD, Cogliatti-Carvalho L, Almeida DR, Freitas AFN (1997) Bromélias: ampliadoras da biodiversidade. *Bromelia* 4: 7-10.
- Smith LB (1934) Geographical evidence on the lines of evolution in Bromeliaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 66: 446-468.
- Smith LB, Downs R J (1979) Bromeliaceae (Bromelioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 1443-2142.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323–354.
- Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Buttow MV, Bered F. Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genet Mol Biol* in press.