

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

**POLIANY DE OLIVEIRA BARBOSA**

**Estrutura e diversidade genética de duas espécies ameaçadas de  
Bromeliaceae no Parque Nacional do Itatiaia**

**ALEGRE, ES**

**FEVEREIRO – 2021**

POLIANY DE OLIVEIRA BARBOSA

**Estrutura e diversidade genética de duas espécies ameaçadas de  
Bromeliaceae no Parque Nacional do Itatiaia**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como requisito do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Tatiana Tavares Carrijo

Coorientador: Dr. Fábio Demolinari de Miranda

Coorientador: Dr. Mário Luís Garbin

**ALEGRE, ES  
FEVEREIRO - 2021**

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

---

B238e      Barbosa, Poliany de Oliveira, 1991-  
Estrutura e diversidade genética de duas espécies ameaçadas  
de Bromeliaceae no Parque Nacional do Itatiaia / Poliany de  
Oliveira Barbosa. - 2021.  
66 f. : il.

Orientadora: Tatiana Tavares Carrijo.

Coorientadores: Fábio Demolinari de Miranda, Mário Luís  
Garbin.

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

1. Aechmea vanhoutteana. 2. conservação. 3. espécies  
ameaçadas. 4. Fernseea itatiaiae. 5. unidades de conservação. I.  
Carrijo, Tatiana Tavares. II. de Miranda, Fábio Demolinari. III.  
Garbin, Mário Luís. IV. Universidade Federal do Espírito Santo.  
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 631.523

---

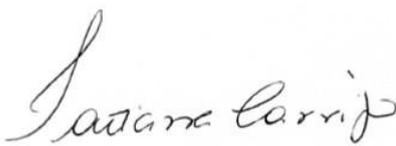
**POLIANY DE OLIVEIRA BARBOSA**

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE DUAS ESPÉCIES AMEAÇADAS DE  
BROMELIACEAE NO PARQUE NACIONAL DO ITATIAIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Alegre/ES, 26 de fevereiro de 2021.

**Comissão Examinadora:**



---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Tavares Carrijo**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientadora)



---

**Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Coorientador)



---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Flores da Silva Ferreira**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Examinadora Interna ao Programa)



---

**Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Amélia Carlos Tuler**  
Instituto Nacional da Mata Atlântica  
(Examinadora Externa ao Programa)

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso o universo de cada um, se resume ao tamanho do seu saber.”  
(Albert Einstein)

## **AGRADECIMENTOS**

Quando comecei a escrever aqui, percebi que durante toda essa jornada eu tenho muito a agradecer, afinal, há poucos anos eu era uma universitária que sonhava com este dia, e ele finalmente chegou. Começo então agradecendo a Deus por tanto amor e pela vida, e pelas oportunidades e pessoas especiais que cruzaram meu caminho e contribuíram para minha caminhada e evolução pessoal.

A minha amada mãe, Kristina, que sempre acreditou em mim e fez tudo o que estava ao seu alcance para que esse momento chegasse.

A toda minha família (Gilson, Delma, Samara, Sunamita, Juliéte, Bernardo e Hugo), por entenderem a minha ausência durante essa jornada. Obrigada pelas risadas, jogos, comidas e conversas extremamente interessantes e ricas. E, principalmente, pelas orações e incentivo.

Agradeço ao CAPES pela bolsa concedida, e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo pelo apoio financeiro concedido via Chamada CNPq/ICMBio/FAPs Nº18/2017 - Pesquisa em Unidades de Conservação da Caatinga e Mata Atlântica, que permitiu o financiamento das atividades desenvolvidas neste trabalho. Agradeço igualmente à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES/CCENS) pelo suporte institucional, e a equipe do Parque Nacional do Itatiaia pelo apoio logístico.

Felizmente eu tenho tantas pessoas para agradecer que se eu quisesse nomeá-las eu precisaria de muitas e muitas páginas, por isso, peço gentilmente que vocês sintam o meu amor e gratidão, caso eu não os mencione. Sem vocês tudo teria sido mais pesado e sem alegria.

Durante essa bela e árdua caminhada encontrei pessoas que além de excelentes profissionais são amigos dedicados e amorosos. Obrigada por serem tão generosos comigo e dividirem tantos momentos ao meu lado. Nesse grupo eu insiro os amigos dos Laboratórios da UFES. Adelson e Lucimara, obrigada por serem luz na minha vida, tem sido um privilégio tê-los como amigos. Fabiano, obrigada pelas caronas e por compartilhar momentos de grande terror em sala de aula; Cris e Felipe, vocês são ótimas companhias para um café! Jheniffer, preciso enaltecer seus biscoitos e sua

amizade! Gabriella e Jéssika, “vencemos juntas”. Vocês alegravam o meu dia mesmo quando a energia (elétrica e a minha) acabava, o resultado falhava, ou simplesmente por serem quem são.

Aos meus queridos e amados amigos que o IFES me presenteou, em especial: Barbara (*happy music* – você alegre a minha vida), Carol (pelas refeições), Daphne (obrigada por ser meu GPS, minha irmã), Felipe (amigo de corrida e terapia), Fernanda (por sempre me socorrer), Flávia (pela gentileza), Ida (por tudo), Isabela Costa (pelas belíssimas ilustrações) Israel (braço direito e cantor), José Dias (amigo exemplar), Larissa (minha irmã e *teacher*), Lessa (companheira de meditação e reflexões), Luana (pelos sustos e fortalecimento do coração), Lucas (amigo para todas as horas), a Simone Carvalho (a amiga mais miss “Gazeta” e “Muqui” que eu tenho e a mais duramente emotiva) dedico. A professora e amiga Dr<sup>a</sup> Aparecida de Fátima Madella de Oliveira, obrigada por tanto! Sem vocês eu não teria conseguido estar aqui finalizando mais um trabalho. Sou mais feliz por causa dos lanches, opiniões, revisões, karaokês e as conversas sem fim (que eu amo) que tivemos. Obrigada por me salvarem quando eu tenho alguma crise existencial.

Aos meus colegas de curso, pelo prazer de tê-los conhecido.

A todo o corpo docente do curso de mestrado, pela contribuição no enriquecimento de meus conhecimentos nas diversas áreas.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Tatiana Tavares Carrijo pelo empenho e apoio durante o desenvolvimento desta dissertação e por todo conhecimento compartilhado.

Aos meus coorientadores, Dr. Fábio Demolinari de Miranda e Dr. Mário Luís Garbin pelo apoio e pelas conversas esclarecedoras e incentivadoras durante esse percurso.

Aos que contribuíram de forma direta ou indireta com esse trabalho, obrigada!

**“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?”  
(Salmos 116:12).**

## **BIOGRAFIA**

Poliany de Oliveira Barbosa, filha de Claudemir Barbosa da Silva e Kristina Oliveira de Souza, natural de Guaçuí - ES, nascida em 07 de janeiro de 1991. Em fevereiro de 2013, ingressou como aluna de graduação no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, no Centro Universitário São Camilo, campus de Cachoeiro de Itapemirim. Concluiu o curso em dezembro de 2015, onde obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas. Em setembro de 2018, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre-ES, na linha de pesquisa Biologia Evolutiva e Citogenética, sob orientação da professora Tatiana Tavares Carrijo e coorientação dos Professores Fábio Demolinari de Miranda e Mário Luís Garbin. Atuou em atividades de pesquisa com ênfase em diversidade genética e genética molecular de espécies vegetais, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2021.

## RESUMO

A maior riqueza de espécies da família Bromeliaceae no Brasil concentra-se na Mata Atlântica, sendo a maioria delas localmente endêmicas e ameaçadas. Nesse sentido, as Unidades de Conservação (UC) desempenham papel central na conservação da biodiversidade, sobretudo de espécies categorizadas sob alguma categoria de ameaça segundo os critérios da IUCN (*Union Internacional for Conservation of Nature's*). Os principais critérios aplicados para o estabelecimento dessa categoria são a quantidade de populações naturais conhecidas, a extensão da área de ocorrência dessas populações e se elas se encontram em áreas protegidas. A diversidade genética das populações, entretanto, permanece pouco explorada para esse propósito. Neste sentido, o objetivo central foi compreender como a diversidade genética está distribuída em populações nativas de duas espécies ameaçadas de Bromeliaceae dentro de uma UC federal, o Parque Nacional do Itatiaia (PNI). As espécies em estudo são *Fernseea itatiaiae* (Wawra) Baker, uma espécie rupícola, categorizada como em perigo (EN), que ocorre nos campos de altitude do PNI, e *Aechmea vanhoutteana* (Van Houtte) Mez, uma espécie predominantemente epifítica, categorizada como vulnerável (VU), ocorrendo na área florestada da mesma UC. Os dados dos indivíduos de ambas as espécies foram obtidos por meio de amostragem adaptativa. Amostras de folhas coletadas em campo foram armazenadas em sacos de papel contendo sílica, seguindo para o laboratório onde o DNA genômico total foi isolado e purificado. A seleção dos *primers* foi a partir de 43 iniciadores do marcador molecular Inter Simple Sequence Repeats (ISSR), escolhido principalmente por não demandar conhecimento prévio do genoma. Sendo discriminados os que apresentaram melhor amplificação em gel de agarose a 2%. Após a triagem foram selecionados 11 primers para a genotipagem das amostras dos 71 indivíduos de *F. itatiaiae*, e 15 primers para os 45 indivíduos de *A. vanhoutteana*. *Aechmea vanhoutteana* apresentou 235 fragmentos amplificados, dos quais 219 foram polimórficos (92,8%), enquanto para *F. itatiaiae*, dos 171 fragmentos amplificados, 155 foram polimórficos (89,8%). A proporção de polimorfismo foi superior ao estabelecido como valor ótimo para monocotiledôneas (40,3%). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi considerado pouco informativo para ambas as espécies, revelando uma média de 0,23 para *F. itatiaiae* e 0,20 para *A. vanhoutteana*. De acordo com o índice de diversidade genética intrapopulacional adaptado para genética de populações naturais, os valores podem variar de 0-1, sendo considerados como valores baixos aqueles que mais se aproximam de zero. Para *Fernseea itatiaiae* constatou-se baixa diversidade genética, resultado fundamentado com base nos valores do índice de diversidade genética de Nei ( $H' = 0,23$ ) e índice de Shannon ( $I = 0,36$ ). Assim como para *A. vanhoutteana*, obtendo-se para diversidade genética de Nei ( $H' = 0,19$ ) de acordo com o índice de Shannon ( $I = 0,34$ ). A formação de grupos genéticos obtidos no dendrograma pelo UPGMA, revelou sete grupos para *F. itatiaiae* e quatro para *A. vanhoutteana*. Os resultados realizados por meio do software Structure, apresentou  $k=2$  para *F. itatiaiae*, e  $k=3$  para *A. vanhoutteana*. Com base nos marcadores utilizados as populações de ambas as espécies se encontram estruturadas. Estes resultados sinalizam a importância de se implementar medidas de proteção às populações de ambas as espécies estudadas ocorrentes nas regiões limítrofes da Unidade de Conservação estudada.

**Palavras-chave:** *Aechmea vanhoutteana*, conservação, espécies ameaçadas, *Fernseea itatiaiae*, unidades de conservação.

## ABSTRACT

The greatest wealth of species of the Bromeliaceae family in Brazil is concentrated in the Atlantic Forest, most of which are locally endemic and threatened. In this sense, the Conservation Units (CU) play a central role in the conservation of biodiversity, especially species classified under some category of threat according to the criteria of the IUCN (Union for Conservation of Nature's). The main criteria applied for the establishment of this category are the number of known natural populations, the extent of the area of occurrence of these populations and whether they are in protected areas. The genetic diversity of populations, however, remains little explored for this purpose. Thus, the central objective of this work was to understand how genetic variability is distributed in native populations of two threatened species of Bromeliaceae within a federal CU, the Itatiaia National Park (INP). The species under study are *Fernseea itatiaiae* (Wawra) Baker, a rupicolous species, categorized as endangered (EN), which occurs in the altitude fields of the INP, and *Aechmea vanhoutteana* (Van Houtte) Mez, a predominantly epiphytic species, categorized as vulnerable (VU), occurring in the forested area of the same CU. Data from individuals of both species were obtained by adaptive sampling. Leaf samples collected in the field were stored in paper bags containing silica, going to the laboratory where the total genomic DNA was isolated and purified. The selection of primers was based on 43 ISSR type primers. This marker was chosen, mainly, because it does not require prior knowledge of the genome. The ones that presented the best amplification in 2% agarose gel were discriminated. After screening the primers, 11 markers were chosen to analyze the DNA samples from 71 individuals of *F. itatiaiae*, and for the 45 individuals of *A. vanhoutteana*, 15 primers were selected. *Aechmea vanhoutteana* presented 235 amplified fragments, of which 219 were polymorphic (92.8%), while for *F. itatiaiae*, of the 171 amplified fragments, 155 were polymorphic (89.8%). The proportion of polymorphism was higher than that established as an optimal value for monocots (40.3%). The polymorphic information content (PIC) was considered uninformative for both species, revealing an average of 0.23 for *F. itatiaiae* and 0.20 for *A. vanhoutteana*. Genetic diversity was assessed assuming that populations were in Hardy-Weinberg equilibrium. According to the intrapopulation genetic diversity index adapted to the genetics of natural populations, the values can vary from 0-1, low values are the ones closest to zero. For *Fernseea itatiaiae*, low genetic diversity was found, a result based on the values of the Nei's genetic diversity index ( $H' = 0.23$ ) and Shannon index ( $I = 0.36$ ). As for *Aechmea vanhoutteana*, obtaining for Nei's genetic diversity ( $H' = 0.19$ ) and Shannon's index ( $I = 0.34$ ). The formation of genetic groups obtained in the dendrogram according to the UPGMA method, revealed seven groups for *F. itatiaiae* and four for *A. vanhoutteana*. The results performed using the Structure software, presented  $k = 2$  for *F. itatiaiae*, and  $k = 3$  for *A. vanhoutteana*. Based on the markers used, the populations of both species studied are structured. These results signal the importance of implementing protection measures for the populations of both studied species occurring in the regions bordering the studied CU, as well as in other locations.

**Keywords:** *Aechmea vanhoutteana*, conservation, threatened species, *Fernseea itatiaiae*, conservation units.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem da espécie *Aechmea vanhoutteana* no Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil.  
Foto: M.M. Moreira..... 25
- Figura 2 - Imagem da espécie *Fernseea itatiaiae* - touceiras - no Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil.  
Foto: M.M. Moreira ..... 26
- Figura 3 - Imagem da espécie *Fernseea itatiaiae* - floração - no Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil.  
Foto: M.M. Moreira..... 26
- Figura 4 - Mapa de localização da área de estudo, indicando o estado (Rio de Janeiro) onde as populações de *F. itatiaiae* (parte alta) e *A. vanhoutteana* (parte baixa) estão localizadas.  
Fonte: a autora ..... 27
- Figura 5 - Disposição dos indivíduos de *Aechmea vanhoutteana* coletados na área de estudo - PNI.  
Fonte: a autora.....29
- Figura 6 - Disposição dos indivíduos de *Fernseea itatiaiae* coletados na área de estudo - PNI.  
Fonte: a autora ..... 30
- Figura 7 – Esquema da amostragem adaptativa para ambas as espécies.  
Fonte: a autora.....31
- Figura 8 - Perfil eletroforético produzido pelo marcador UBC 840 em 71 indivíduos de *Fernseea itatiaiae* – Marcador de peso molecular (*Ladder* 100pb) .....37
- Figura 9 – Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método UPGMA no programa GENES, para 71 indivíduos de *Fernseea itatiaiae*, formando 7 grupos em toda a amostragem populacional. Ponto de Corte (PC): 74%.....38
- Figura 10 - Abordagem Bayesiana (software Structure) de 71 indivíduos de *F. itatiaiae* ocorrentes na parte alta do PNI. A- Gráfico da média  $\pm$  o desvio padrão de LnP(K). B - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos, indicando k=2. C - Saída de dados do método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) usando o software Structure Harvester, indicando a média  $\pm$  o desvio padrão de LnP(K)..... 39
- Figura 11 - Perfil eletroforético produzido pelo marcador UBC 861 em 45 indivíduos de *A. vanhoutteana* – Marcador de peso molecular (*Ladder* 100p)..... 41
- Figura 12 - Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método UPGMA no programa GENES, para 45 indivíduos de *Aechmea vanhoutteana*, formando 4 grupos

em toda a amostragem populacional. Ponto de Corte (PC):  
81%.....42

Figura 13 - Abordagem Bayesiana (software Structure) de 45 indivíduos de *A. vanhoutteana* ocorrentes na parte baixa do PNI. A- Gráfico da média  $\pm$  o desvio padrão de  $\ln P(K)$ . B - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos, indicando  $k=3$ . C - Saída de dados do método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) usando o software Structure Harvester, indicando a média  $\pm$  o desvio padrão de  $\ln P(K)$ ..... 43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – *Primers* ISSR selecionados para *F. itatiaiae* incluindo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer*, faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB).....p.36

Tabela 2 – *Primers* ISSR selecionados para *A. vanhoutteana* incluindo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer*, faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB).....p.40

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	23
<b>4. OBJETIVO</b>	24
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
5.1. Espécies estudadas	25
5.2. Local do estudo	26
5.3. Amostragem populacional	28
5.4. Extração de DNA	32
5.5. Amplificações <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> – ISSR	32
5.6. Análise dos dados moleculares	33
<b>6. RESULTADOS</b>	36
6.1. Seleção dos <i>primers</i> ISSR para <i>Fernseea itatiaiae</i>	36
6.2. Estrutura e diversidade genética em <i>Fernseea itatiaiae</i>	37
6.3. Seleção dos <i>primers</i> ISSR para <i>Aechmea vanhoutteana</i>	39
6.4. Estrutura e Diversidade Genética de <i>Aechmea vanhoutteana</i>	41
<b>7. DISCUSSÃO</b>	43
7.1. Estrutura e diversidade Genética	43
<b>8. CONCLUSÃO</b>	48
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	49
<b>APÊNDICE A</b> - Compilado dos estudos de diversidade e estrutura genética realizados para populações naturais na família Bromeliaceae destacando os marcadores moleculares utilizados.	63
<b>APÊNDICE B</b> - <i>Primers</i> ISSR produzidos pela University of British Columbia e suas respectivas sequências utilizados para amplificação, com temperatura de anelamento (T <sub>m</sub> ) em amostras de DNA de 2 indivíduos da espécie <i>F. itatiaiae</i> e <i>A. vanhoutteana</i> .	66

## 1. INTRODUÇÃO

Bromeliaceae Juss. é uma família de angiospermas quase que exclusivamente neotropical (MARTINELLI *et al.*, 2008), que reúne 70 gêneros e cerca de aproximadamente 3.650 espécies (GOUDA; BUTCHER; GOUDA, 2018). Seus representantes são ervas de folhas sésseis, cuja superfície é revestida por tricomas absorventes de água e nutrientes, com flores dispostas em inflorescências e frutos que podem ser carnosos ou secos (RIBEIRO *et al.*, 1999; GOETZE *et al.*, 2014). As espécies de Bromeliaceae podem ser encontradas desde a região sul da América do Norte até a Patagônia (SMITH; DOWNS, 1974; WANDERLEY; MARTINS, 2007; THE PLANT LIST, 2013), ocorrendo desde o nível do mar até os elevados altiplanos da cordilheira dos Andes, em florestas úmidas como a Mata Atlântica ou regiões áridas como a Caatinga, bem como em solos sujeitos a inundações regulares (BENZING, 2000; BFG, 2015).

O Brasil é conhecido por ser um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae na América do Sul (BFG, 2018). Estima-se que cerca de 87% das espécies e 73% dos gêneros conhecidos para essa família ocorram no país (BFG, 2018, FLORA DO BRASIL, 2020). Dos 56 gêneros e 1.379 espécies que ocorrem no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020), 24 gêneros e 1.178 espécies são endêmicas do país. Espécies endêmicas de Bromeliaceae são, com frequência, altamente especializadas a determinados ambientes, como por exemplo, as de campos de altitude (e.g., OLIVEIRA, 2012, CARVALHO, 2015, JUNIOR, 2017), e *inselbergs* (SARTHOU *et al.*, 2001, POREMBSKI *et al.*, 2007), enquanto outras são predominantemente epifíticas (AXIMOFF; ALVES; RODRIGUES, 2014). Espécies com esses hábitos são frequentemente endêmicas e localmente conhecidas por um número restrito de populações, o que contribui para que sejam categorizadas como ameaçadas.

Espécies ameaçadas são aquelas que se enquadram em alguma das três categorias estabelecidas pela *International Union for Conservation of Nature's* - IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza): vulnerável (VU), em perigo (EN) e criticamente em perigo (CR). Os principais critérios utilizados para categorizar essas

espécies são baseados em parâmetros quantitativos como redução populacional (quantificação em % da redução populacional em um determinado período), distribuição geográfica (tamanho da extensão de ocorrência da espécie, e também a área de ocupação) e o tamanho e dinâmica populacional (número de indivíduos maduros presentes na população) e análise quantitativa mostrando a probabilidade de extinção na natureza em relação ao tempo ou ao número de gerações (IUCN, 2013).

Apesar da diversidade genética ser um parâmetro que subsidia a manutenção, principalmente de espécie ameaçada no ambiente a qual está inserida, é possível perceber que aspectos relacionados à diversidade genética das populações naturais, no entanto, não figuram entre os critérios utilizados para o estabelecimento destas categorias de espécies ameaçadas. Deixando uma lacuna quando se pensa em um estudo de conservação de espécies com algum grau de ameaça.

Considerando que a diversidade genética é o material bruto sobre qual a seleção natural atua para permitir a adaptação e evolução dos organismos, e a sua adequação às mudanças ambientais (FRANKHAM *et al.*, 2008), entender como a variabilidade genética de uma espécie está distribuída em suas populações torna-se essencial para garantir a sua conservação (REIS, 1999, MAMURIS; SFOUGARIS; STAMATIS, 2001, PRIMACK; RODRIGUES, 2001, PITHER *et al.*, 2003, CAVALLARI, 2004, NORRIS, 2012).

Em razão das particularidades de cada espécie, como as diferentes respostas às pressões as quais suas populações estão submetidas, a constante atualização das informações sobre seu status de ameaça também é essencial para consolidar sua eficácia como subsídio à proposição de políticas públicas para o planejamento da conservação, especialmente no caso das espécies ameaçadas de extinção (JAMES; ASHBURNER, 1997, PRIMACK; RODRIGUES, 2001, GITZENDANNER *et al.*, 2012).

E é com esse intuito que surgem as Unidades de Conservação (UC) visando sobretudo a conservação dos recursos naturais, principalmente de espécies ameaçadas. Essas UCs são áreas protegidas conforme a Lei Federal nº 9.985 de 18 de julho de 2000. Permitindo assim o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação pois, para que haja uma efetiva conservação da diversidade genética

das espécies ameaçadas, é fundamental conhecer quais são os locais ou populações onde a diversidade genética está concentrada.

Portanto, objetivou-se avaliar como a diversidade genética está distribuída em populações nativas de duas espécies ameaçadas de Bromeliaceae (*Fernseea itatiaiae* (Wawra) Baker e *Aechmea vanhoutteana* (Van Houtte) Mez dentro de uma unidade de conservação (Parque Nacional do Itatiaia). A amostragem dos indivíduos foi realizada por meio de amostragem adaptativa.

As duas espécies são endêmicas da Mata Atlântica. Estudos baseados em biogeografia demonstram que *Fernseea itatiaiae* ocorre estritamente no Atlântico, mais especificamente nos limites geográficos delimitados pelo Parque Nacional do Itatiaia (MONTEIRO, 2020). *Fernseea itatiaiae* está categorizada como em perigo (EN) (MONTEIRO, 2020), e *A. vanhoutteana* está categorizada como vulnerável (VU) (FARIA *et al.*, 2020), pelo Centro Nacional para Conservação da Flora (CNC Flora, 2020).

Para analisar a diversidade e a estrutura genética de cada uma das populações das espécies, utilizou-se o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), o qual não demandar conhecimento prévio do genoma, contribuindo para que os resultados encontrados neste estudo possam ser comparados através dos índices encontrados e a estruturação das populações estudadas, sendo utilizados em estudos futuros realizados com espécies ameaçadas em unidades de conservação, que não possuam microssatélites desenvolvidos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A diversidade genética há muito é reconhecida como um fator importante na formação de muitas características de uma população. Podendo ser afetada pela interação entre diferentes processos, tais como mutações, deriva genética, sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção (SALES *et al.*, 2001; CONTE, 2004). Entender como essas interações acontecem é importante, pois pode ajudar a compreender os processos de adaptação às circunstâncias ecológicas (PARKER *et al.* 1998, BENZING *et al.*, 2000; CRAYN; WINTER; SMITH, 2004). Ou seja, pode-se compreender a diversidade genética não como um atributo fixo das populações, mas

como um elemento dinâmico que se estrutura no espaço e no tempo em resposta às condições e aos recursos em constante mudança do ambiente (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Independentemente do padrão da diversidade genética de cada espécie, a manutenção da variabilidade genética é considerada essencial para a preservação do seu potencial evolutivo (LOVELESS; HAMRICK, 1984; FISCHER *et al.*, 2000, JAGGI; WIRTH; BAUR, 2000, TANSLEY; BROWN, 2000, FLEISHMAN *et al.*, 2001; ZUCCHI, 2002, ALMEIDA *et al.*, 2012), e para sua sobrevivência em longo prazo (TANSLEY; BROWN, 2000), já que a redução da variabilidade genética pode conduzir uma espécie à extinção (SHARMA; CLEMENTE; JONES, 2000, BOUZAT, 2001; SHARMA, 2001). E é nesse contexto que a genética da conservação ganha destaque, visto que ela oferece informações que podem ser utilizadas para avaliar o risco de extinção de espécies, inclusive àquelas que já estão sobre algum grau de ameaça segundo os critérios da IUCN.

A genética da conservação, como campo de estudo, atua com base em análises genéticas moleculares. Um dos principais objetivos desta área da ciência é elucidar aspectos genéticos das espécies considerados relevantes para o seu manejo e conservação (e.g., MARTINS, 1988, MAMURIS; SFOUGARIS; STAMATIS, 2001, SHARMA; CLEMENTE; JONES, 2000, BEKESSY *et al.*, 2002, FRANKHAM *et al.*, 2008). Sua relevância se dá principalmente quando se trata de espécies raras ou endêmicas, de distribuição restrita, que normalmente apresentam variabilidade genética reduzida, por exibirem populações pequenas e isoladas (FISCHER, 1930, WRIGHT, 1931, ver HARTL; CLARK, 1997; para mais exemplos ver, entre outros, HORNUNG-LEONI *et al.*, 2013, MACHADO; FORZZA; STEHMANN, 2016, CASCANTE-MARÍN *et al.*, 2019), no entanto, podem-se encontrar exceções a este padrão (MATOCQ; VILLABLANCA, 2000) em algumas espécies da família Bromeliaceae (e.g. ZANELLA *et al.*, 2012, LOH *et al.*, 2015).

Estudos de genética da conservação realizados em populações da família Bromeliaceae são escassos, considerando-se a elevada riqueza de espécies desta família de angiospermas. Dos 70 gêneros e aproximadamente 3.650 espécies conhecidas (GOUDA; BUTCHER, GOUDA, 2018), apenas 46 espécies distribuídas em 11 gêneros tiveram populações de suas espécies estudadas (Apêndice A):

*Aechmea Ruiz & Pav.* (MURAWSKI; HAMRICH, 1990; IZQUIERDO; PIÑERO, 2000, ALMEIDA, 2006; ZANELLA, 2012, GOETZE *et al.*, 2015, 2016, 2017, 2018; LOH *et al.*, 2015; SHEU *et al.*, 2017; MEIRELES; MANOS, 2018), *Alcantarea* (E.Morren ex Mez) *Harms.* (BARBARÁ *et al.*, 2007, 2009; ZANELLA *et al.*, 2012; LEXER *et al.*, 2016), *Billbergia Thunb.* (MIRANDA *et al.*, 2012, SHEU *et al.*, 2017), *Bromelia L.* (ZANELLA *et al.*, 2011, 2012), *Dyckia Schult. & Schult. f.* (HMELJEVSKI *et al.*, 2007, 2011; ZANELLA *et al.*, 2012; ROGALSKI *et al.*, 2017, RUAS, 2018), *Encholirium Mart. ex Schult.f.* (CAVALLARI *et al.*, 2006; ZANELLA *et al.*, 2012; HMELJEVSKI; REIS; FORZZA, 2015, 2017; GONÇALVES-OLIVEIRA *et al.*, 2017), *Lymania Read* (PAMPONET *et al.*, 2013), *Pitcairnia L'Hér.* (BOISSELIER-DUBAYLE *et al.*, 2010; SARTHOU *et al.*, 2010; PALMA-SILVA *et al.*, 2011; ZANELLA *et al.*, 2012; SOUZA-SOBREIRA *et al.*, 2015), *Puya Molina* (SGORBATI *et al.*, 2004), *Tillandsia L.* (SOLTIS; RIESEBERG; GARDNER, 1987; GONZÁLEZ-ASTORGA *et al.*, 2004; ZANELLA *et al.*, 2012, GONÇALVES, 2018) e *Vriesea Lindl.* (ALVES *et al.*, 2004; PALMA-SILVA *et al.*, 2009; ZANELLA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013; LAVOR *et al.*, 2014; NERI; WENDT; PALMA-SILVA, 2017; SOARES *et al.*, 2018).

Diversos marcadores moleculares foram utilizados para acessar a diversidade genética em Bromeliaceae, contribuindo para que os resultados referentes aos padrões demonstrassem a variação nos seus índices (ZANELLA *et al.*, 2012b). Essas diferenças na estrutura populacional das plantas podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como os efeitos de dispersão de pólen e semente, crescimento clonal, taxas de fluxo gênico e conectividade entre populações. Conforme abordam Sunnucks (2000) e Avise (2004), a escolha adequada de marcadores moleculares, principalmente quando aliados à modelos de genética de populações é importante, pois é através desses resultados que se pode conhecer um pouco mais sobre a história de vida, evolução e relações entre os organismos.

O acesso a esses dados é importante, pois ajuda a obter estimativas para calcular a diversidade genética entre populações, alguns dos cálculos podem incluir a análise da frequência alélica, número de alelos e heterozigosidade. Dentre os marcadores para obtenção destas estimativas em Bromeliaceae figuram as Isoenzimas, o RAPD (Sigla em inglês para - *Random Amplified Polymorphic DNA* - Amplificação Aleatória de DNA polimórfico), AFLP (Sigla em inglês para - *Amplified*

*Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado), RFLP (Sigla em inglês para - *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação), ISSR (Sigla em inglês para - *Inter Simple Sequence Repeat* - Inter Repetições de Sequência Simples), SSR (Sigla em inglês para - *Simple Sequence Repeats* - microssatélites) e os minissatélites.

Algumas particularidades precisam ser levadas em consideração quando se escolhe um marcador, por exemplo, os marcadores RAPD são os mais simples para serem utilizados, mas apresentam sérios problemas de repetibilidade. Os marcadores AFLP são extremamente robustos revelando grande quantidade de locos e com alta repetibilidade, entretanto, possui problemas de custo elevado quando comparado a outros marcadores (IDREES; IRSHAD, 2014).

Em Bromeliaceae, os marcadores mais utilizados são os SSR, seguido pelas aloenzimas, CpDNA e PhyC, RAPD, ISSR e AFLP (RUAS, 2018). O uso frequente do marcador SSR se justifica por ser um grupo de marcadores altamente informativos devido à natureza multialélica e codominante, reprodutibilidade, herdabilidade, abundância relativa e extensa cobertura do genoma (YAMAMOTO *et al.*, 2002). No entanto, o uso deste marcador requer um alto investimento inicial, quando comparado aos marcadores do tipo ISSR, por exemplo, já que inicialmente necessita-se de sequências específicas de *primers* (MÖLLER; PINHEIRO, 2014), dificultando seu uso de forma ampla.

Os marcadores ISSR foram desenvolvidos em pesquisas independentes como as de Zietkiewicz, Rafalski e Labuda (1994), e são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética com foco nas populações naturais (ANSARI *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2014; MORAES; BONIFÁCIO-ANACLETO; ALZATE-MARIN, 2015, NOROOZISHARAF *et al.*, 2015). Possuem caráter dominante, conduzem a altos padrões polimórficos e não requerem informações prévias de sequências de DNA da espécie alvo, tendo sido bastante popularizado com os trabalhos de Wolfe e Liston (1998). Como o próprio nome diz, os marcadores do tipo ISSR anelam-se dentro das repetições e amplificam as regiões genômicas entre os microssatélites (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Estima-se que o método apresente de 92 a 95% de repetibilidade, possivelmente devido ao uso de *primers* longos quando comparado com os de outros

tipos de marcadores moleculares (BORNET; BRANCHARD, 2001, REDDY; SARLA; REDDY, 2002). Este marcador também tem sido utilizado em populações de plantas silvestres para acessar a caracterização genética de diferentes espécies sem a influência do ambiente (REIF *et al.*, 2004, CORTESI *et al.*, 2005; PHARMAWATI; YAN; FINNEGAN, 2005, HASSEL *et al.*, 2005, ISSHIKI; IWATA; KHAN, 2008; MANICA-CATANI *et al.*, 2009, GEORGE; SHARMA; YADON, 2009; LUDTKE *et al.*, 2010, TANYA *et al.*, 2011; POCZAI *et al.*, 2011). Além disso, entre os marcadores moleculares baseados na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o método se faz muito adequado, pois podem ser transferidos para qualquer espécie de planta (SOUZA *et al.*, 2005).

Diferentes estudos utilizando diversos tipos de marcadores moleculares para estudar a genética de populações (LAVOR *et al.*, 2014) de espécies de Bromeliaceae foram utilizados, como por exemplo a divergência entre populações e espécies (SARTHOU *et al.*, 2001; BARBARÁ *et al.*, 2007; PALMA-SILVA *et al.*, 2009). Podemos citar o estudo feito em 2002 por Chen-HungChi e colaboradores (2002), em que seu trabalho mostrou que entre dezoito indivíduos de sete gêneros de Bromeliaceae, 30 marcadores RAPD foram úteis para discriminação dos gêneros e das espécies, inclusive aquelas com alta similaridade morfológica.

Já Boneh e colaboradores (2003), estudaram espécies ornamentais de Bromeliaceae com base em SSR, e viram que o nível de polimorfismo gerado pelos microsatélites nos dois trabalhos foi útil para comparação da estrutura genética de populações fragmentadas das espécies estudadas. Como citado, marcadores codominantes (SSR) destacam-se por serem os mais utilizados na família, totalizando dez trabalhos em treze espécies (BARBARÁ *et al.*, 2007a, 2009, PALMA-SILVA *et al.*, 2009, 2011, BOISSELIER-DUBAYLE *et al.*, 2010, ZANELLA *et al.*, 2011, CARLIER *et al.*, 2012, LAVOR *et al.*, 2014, GOETZE *et al.*, 2015, HMELJEVSKI *et al.*, 2015). Exemplos de gêneros estudados são *Tillandsia* (SOLTIS *et al.*, 1987; GONZÁLEZ-ASTORGA *et al.*, 2004), *Aechmea* (MURAWSKI; HAMRICK, 1990; IZQUIERDO; PIÑERO, 2000; ALMEIDA, 2006), *Pitcairnia* L'Hér. (SARTHOU *et al.*, 2001; BOISSELIER-DUBAYLE *et al.*, 2010; PALMA-SILVA *et al.*, 2011), *Puya* (SGORBATI *et al.*, 2004), *Alcantarea* E. Morren ex Mez (BARBARÁ *et al.*, 2007a, 2009), *Vriesea* (ALVES *et al.*, 2004; SILVA, 2008, PALMA-SILVA *et al.*, 2009,

ZANELLA, 2013), *Bromelia antiacantha* Bertol. (ZANELLA *et al.*, 2011), *Dyckia* Schult. f. (HMELJEVSKI *et al.*, 2011), *Encholirium* Mart. ex Schult. (CAVALLARI *et al.*, 2006). Dentro do gênero *Aechmea*, dez SSR foram isolados e caracterizados para as espécies *Aechmea caudata* (GOETZE *et al.*, 2014), e *Aechmea fulgens* Brongn, e alguns estão disponíveis para poucas espécies, como exemplo, *Ananas comosus* (WÖHRMANN; WEISING, 2011) e *Orthophytum ophiuroides* (AOKI-GONÇALVES *et al.*, 2014).

No entanto, outros trabalhos interessantes foram realizados por meio de diferentes marcadores, como o de Cavallari e colaboradores (2006), que utilizando o marcador RAPD puderam observar a diversidade genética em três espécies do gênero *Encholirium* conseguindo definir dentre as espécies de *E. biflorum* e *E. pedicellatum* quais espécies estavam criticamente ameaçadas de extinção, concluindo que a retirada de um único indivíduo do habitat implicaria em perda significativa da diversidade genética na natureza e, portanto, deveria ser evitada.

Almeida (2006), estudou a diversidade de populações da espécie *Aechmea fulgens* em fragmentos da Mata Atlântica em Pernambuco, utilizando marcadores de natureza dominante, ISSR, e codominante, SSR. Os dados observados pela autora demonstraram alta variabilidade para a espécie, sendo a maior parte da variabilidade total determinada entre indivíduos dentro das populações e uma baixa diferenciação foi verificada entre as populações analisadas.

Em 2012, Zhang e colaboradores (2012), realizaram oito combinações de *primers* AFLP demonstrando variabilidade e diversidade genética entre as bromélias do gênero *Aechmea*. No mesmo ano, Zhang e colaboradores (2012), utilizando 12 marcadores ISSR observaram que os dados gerados revelaram alta diversidade genética dentro do grupo de bromélias (*Neoregelia*, *Guzmania*, *Vriesea* e *Aechmea*) investigadas.

Além de estudar a diversidade genética dentro ou entre populações da mesma área, há também a possibilidade de entender como a diversidade genética de uma espécie está estruturada em diferentes áreas, como o trabalho realizado por Almeida e colaboradores (2012), que utilizaram oito marcadores ISSR para *Aechmea fulgens* em três áreas de estudos, sugerindo que a fragmentação teve baixo impacto na

diversidade genética da espécie, indicando a existência de fluxo gênico entre as áreas de estudo. Pamponet e colaboradores (2013), também realizaram um estudo similar, usando RAPD, e concluíram que o alto grau de estrutura genética em *Lymania azurea* indicava que todos os indivíduos de faixa livre eram vitais para a manutenção da diversidade genética atual. Ou seja, a remoção de plantas das populações deveria ser realizada exclusivamente para fins de conservação *ex situ* ou para manter a representação deste importante recurso genético.

Em 2013, no Peru, Hornung-Leoni e colaboradores (2013), realizaram um estudo por meio de perfis AFLP. Os indivíduos das diferentes populações estudadas de *Pitcairnia raimondii* se agruparam, sugerindo dispersão à longa distância. Ribeiro e colaboradores (2013), investigaram a variabilidade genética das populações conhecidas de *Vriesea cacuminis*, demonstrando ser possível comparar a diversidade entre áreas protegidas e áreas desprotegidas por meio do uso de marcadores ISSR. Em 2015, Souza-Sobreira e colaboradores (2015), analisaram a espécie *Pitcairnia flammaea* (L.) John e viram que 18 marcadores ISSR foram suficientes para mostrar que as três populações de *P. flammaea* estudadas apresentam diversidade genética, indicando um bom estado de conservação.

Como demonstrado, pesquisas em genética de populações são importantes, pois apresentam dados que podem ser utilizados como base ou para definir unidades de conservação e/ou estabelecer prioridades para o plano de manejo dos recursos genéticos (COATES; ATIKINS, 2001, FLEISHMAN *et al.*, 2001; JAGGI *et al.*, 2000; JONES; GLIDDON; GOOD, 2001; TANSLEY; BROWN, 2000), principalmente de espécies com algum grau de ameaça. Embora possa-se lançar mão de vários tipos de marcadores genéticos dependendo do objetivo do estudo, é importante ressaltar que os marcadores do tipo ISSR são considerados uma boa ferramenta para acessar a diversidade genética, pois eles trazem a facilidade do RAPD com a robustez dos marcadores AFLP e SSR, sendo assim recomendados para estudos que exigem confiabilidade sem alto investimento para as análises.

O desenvolvimento de diferentes marcadores moleculares e o avanço em se obter os mais eficientes e menos dispendiosos, possibilitou o avanço do conhecimento sobre a diversidade genética de populações naturais de plantas, essas pesquisas tiveram muito sucesso em ambiente como a Mata Atlântica (CHEN *et al.*,

2002, CAVALLARI *et al.*, 2006). Mesmo sendo conhecida como um dos *hotspots* mundiais, a Mata Atlântica ainda possui poucos estudos genéticos com o intuito de examinar espécies de plantas neotropicais ou com a intenção de investigar aspectos genéticos das bromélias nesse bioma comparado às florestas temperadas (CAVALLARI *et al.*, 2006; BARBARÁ *et al.*, 2007; PALMA-SILVA *et al.*, 2009; VERSIEUX *et al.*, 2012; ZANELLA *et al.*, 2012; LAVOR *et al.*, 2014; GOETZE *et al.*, 2015). Além de se estudar a diversidade genética de uma população, é essencial que também se estude onde a espécie está inserida, pois de acordo com Abreu e colaboradores (2014), entender onde ocorre a estruturação genética de organismos sésseis, como as plantas, pode ajudar a compreender como acontece a interação íntima e permanente com o ambiente em que estão inseridas.

Estudar aspectos relacionados à estrutura genética de uma população significa entender a distribuição da heterogeneidade dos genótipos e da diversidade genética dentro e entre as populações, a fim de se descrever como essa informação pode ser útil para a conservação e o manejo das espécies (KAMADA *et al.*, 2009). Pois os resultados da estrutura genética das populações naturais de plantas ajudam a entender quais os processos de adequação, especiação, fluxo gênico, processos ecológicos e evolutivos podem influenciar na dinâmica das populações naturais de plantas (BARBARÁ *et al.*, 2009).

Determinar como uma população está estruturada em um ambiente é difícil, pois existem vários desafios para conseguir separar os efeitos do espaço e do meio ambiente. No caso em que o fluxo gênico é restrito, pode-se esperar encontrar uma correlação entre a distância espacial e genética: os indivíduos mais próximos no espaço também têm maior probabilidade de estar relacionados (HARDY; VEKEMANS 1999). Este padrão, que é chamado Isolamento por distância (IbD), assume a ausência de seleção natural, surge como resultado da deriva genética local determinando a diferenciação populacional sob fluxo gênico restrito de tal forma que a distância geográfica se torna o principal ou único preditor de parentesco genético entre os indivíduos (SEXTON *et al.*, 2014), já o isolamento por ambiente (IbE) enfatiza o papel da heterogeneidade ambiental na criação de nichos específicos, onde processos como a adaptação local podem ocorrer. É a ideia de que variações ambientais podem moldar como a diversidade genética, ou seja, que a diferenciação

genética aumenta com as diferenças ambientais, independentemente da distância geográfica (WANG; BRADBURD, 2014). O processo de deriva genética, através do qual as frequências alélicas variam de forma aleatória ao longo do tempo, terminará por determinar a existência de grupos genéticos distintos, tão diferentes entre si quanto maior for a distância geográfica que os separa (SEXTON *et al.*, 2014).

Entende-se, portanto, que estudos sobre estrutura e diversidade genética são importantes, pois apoiam o desenvolvimento de estratégias de conservação para espécies ameaçadas de extinção e ecologicamente importantes.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A diversidade genética das populações não faz parte dos critérios utilizados para categorizar uma espécie como ameaçada. Somado a isso, há pouca informação na literatura sobre espécies localmente endêmicas conhecidas por uma ou no máximo duas localidades. Esta é a situação de muitas espécies de Bromeliaceae ocorrentes na Mata Floresta Atlântica, para as quais a diversidade genética ainda permanece pouco acessada.

As técnicas moleculares tornaram possível distinguir a estrutura genética, dentro e entre populações, e têm auxiliado no esclarecimento dos padrões de fluxo gênico, dispersão e seleção (CAVERS *et al.*, 2005).

Para desenvolvimento do estudo utilizou-se o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Este marcador tem sido utilizado em estudos populacionais com espécies de plantas por serem considerados uma forma rápida e reprodutível de acessar a diversidade genética, pois são capazes de identificar populações geneticamente próximas (SICARD *et al.*, 2005). Por ser considerado um marcador universal, estes marcadores não demandam conhecimento prévio do genoma, de forma que podem ser aplicados com facilidade para estudar espécies ameaçadas nativas da Mata Atlântica.

A grande vantagem desse tipo de marcador (ISSR) é que eles podem ser utilizados para análises de espécies que possuem algum tipo de relação evolutiva, obtendo-se resultados confiáveis, devido sua abundância e dispersão no genoma (RODRIGUES, 2010). Desta forma, esses marcadores despontam como importantes ferramentas para a análise da diversidade genética em populações de espécies

ameaçadas de Bromeliaceae ocorrentes em Unidades de Conservação, para as quais não há microssatélites desenvolvidos.

#### **4. OBJETIVO**

Investigar como a diversidade genética está distribuída em populações nativas de duas espécies ameaçadas de Bromeliaceae (*Fernseea itatiaiae* e *Aechmea vanhoutteana*) dentro de uma unidade de conservação (Parque Nacional do Itatiaia). *Fernseea itatiaiae* está categorizada como em perigo (EN) e *A. vanhoutteana* está categorizada como vulnerável (VU) pelo Centro Nacional para Conservação da Flora (CNC Flora, 2020). Para tanto, foi necessário:

- Implementar a obtenção de amostras para análise genética por meio de amostragem adaptativa;
- Mensurar como a diversidade genética está distribuída ao longo da área de ocupação das populações naturais dentro da UC estudada;
- Caracterizar o padrão da diversidade genética dentro de cada população.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Espécies estudadas

*Aechmea vanhoutteana* (do grego: folhas ponta de lança) é uma espécie endêmica da região Sudeste do Brasil (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) (FARIA *et al.*, 2020), sendo que a maior parte das populações se concentram na Mata Atlântica (SMITH, 1934) (Figura 1). São epífitas, raramente rupícolas ou terrícolas, sendo encontradas apenas na parte baixa do Parque Nacional do Itatiaia (PNI). Sua época de floração ocorre nos meses de junho e outubro (WANDERLEY; MARTINS, 2007).



Figura 1. Indivíduo *Aechmea vanhoutteana* no Parque Nacional do Itatiaia – RJ. Foto: M.M. Moreira.

A enorme diversidade estrutural e morfológica junto com a má compreensão da delimitação natural dessas espécies, e, portanto, dos subgêneros, faz de *Aechmea* um dos maiores desafios taxonômicos em Bromeliaceae (LEME *et al.*, 2010).

Esta espécie foi classificada como vulnerável (VU) pelo CNC Flora (DE FARIA; WENDT; BROWN, 2020), dado que as áreas de ocorrência dessa espécie estão sujeitas a incêndios que afetam continuamente a qualidade do seu ambiente, sendo considerada uma espécie criticamente em perigo, segundo o Livro vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI; MORAES, 2013).

*Fernseea itaiaiae* é uma espécie endêmica da Serra da Mantiqueira, sendo encontrada apenas na região do Itatiaia, na divisa entre Minas Gerais e Rio de Janeiro

(Figuras 2 e 3). Seu epíteto específico refere-se ao ponto de coleta do tipo, Planalto de Itatiaia, em Serra da Mantiqueira.

Wawra (1880), afirmou que *Fernseea itatiaiae* cresce nos campos de altitudes no Brasil, entre 2700 e 3000m, não tendo ocorrências em elevações. No entanto, hoje sabe-se que a maior parte das populações desta espécie ocorre no PNI, crescendo na área dos campos de altitude, entre 1900 e 3000 m de altitude, sendo essencialmente rupícola (LIMA, 2008; MONTEIRO, 2020).



Figuras 2 e 3. *Fernseea itatiaiae*, considerando: touceiras (esquerda); espécie em floração (direita). Foto: M. M. Moreira.

É uma planta rupícola com 27- 60cm de altura. A floração concentra-se entre junho e outubro, com pelo menos um registro indicando floração para cada um dos demais meses do ano. A espécie foi avaliada como em perigo (EN) (MONTEIRO, 2020), considerando principalmente sua área de ocorrência restrita ao Planalto do Itatiaia com alto risco de extinção por causa da sua distribuição restrita (EOO= 2.710,73 km<sup>2</sup>) na Serra da Mantiqueira entre Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, na qual incêndios quase que anuais resultaram em declínio das populações e da qualidade do ambiente (MARTINELLI; MORAES, 2013).

## 5.2. Local do estudo – Parque Nacional do Itatiaia (PNI)

O estudo foi realizado no Parque Nacional do Itatiaia (PNI). Esta Unidade de Conservação foi a primeira área protegida criada no Brasil através do Decreto Federal nº 1.713, de 14 de junho de 1937, com área de 11.943 hectares (Decreto nº 23.793, de 23 de janeiro de 1934). A partir do Decreto nº 87.586 de 20 de setembro de 1982 seus limites foram ampliados possuindo uma extensão territorial de aproximadamente 30.000 ha.

O parque está localizado no maciço do Itatiaia, ao sul dos estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, entre as latitudes 22° 19' e 22° 45' S e longitudes 44° 45' e 44° 50' W. Abrangendo partes elevadas da Serra da Mantiqueira, com altitudes entre 700 e 2.787m, onde o pico das "Aguilhas Negras" se destaca como ponto culminante. O clima no PNI é mesotérmico com temperatura média anual, dependendo da altitude, entre 15° e 27° C, observando-se diferença de 700 mm na pluviosidade média em função da altitude. O relevo é montanhoso, incluindo encostas e o topo do planalto, onde emergem notáveis penhascos rochosos.

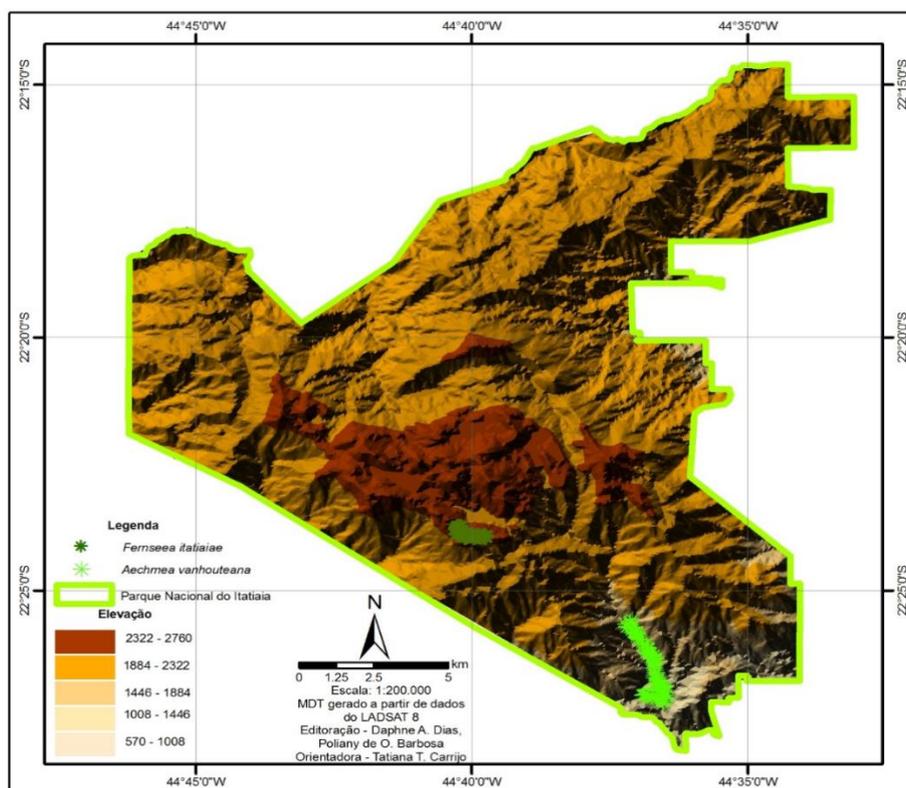


Figura 4. Mapa de localização da área de estudo, indicando o estado (Rio de Janeiro) onde as populações de *F. itatiaiae* (parte alta) e *A. vanhouteana* (parte baixa) ocorrem.

Dois áreas distintas são reconhecidas no PNI (Figura 4), cada uma possui a sua própria entrada para acesso. Uma área é denominada como parte baixa (área formações florestais) e outra denominada parte alta (área dominada pelos campos de altitude).

Cabe ressaltar que metade da extensão dos campos de altitude do estado do Rio de Janeiro está situada no maciço do Itatiaia (AXIMOFF, 2011). A elevada riqueza de espécies aliada ao grande número de endemismos torna a região alto Montana do PNI um local com características únicas, fazendo com que o conhecimento de sua

flora seja algo indispensável para discussão de medidas conservacionistas. Além disso, quase toda a vegetação natural fora dos limites do Parque Nacional do Itatiaia foi dizimada, e a esta Unidade de Conservação, uma ilha de biodiversidade, cabe a missão de funcionar como um centro de riqueza genética e de práticas conservacionistas (AXIMOFF; ALVES; RODRIGUES, 2014).

### **5.3. Amostragem populacional**

A questão inicial de qualquer procedimento de amostragem é a obtenção de estimativas fidedignas de alguma característica da população que será estudada, tomando como base somente uma parte dessa população (THOMPSON; SEBER, 1996). No intuito de realizar uma representatividade mais real, evitando uma certa tendenciosidade é que Thompson (1990), sugere a amostragem adaptativa. A amostragem adaptativa é um procedimento que se adapta de forma satisfatória a esse tipo de padrão de distribuição espacial, haja vista que consiste em um procedimento de amostragem em que a seleção de novas unidades de amostra fundamenta-se na ocorrência de indivíduos da espécie de interesse nas unidades de amostra já selecionadas no levantamento (THOMPSON, 1990, 1991; THOMPSON; SEBER, 1996; SALEHI; SEBER, 1997).

A amostragem de *A. vanhoutteana*, foi realizada na parte baixa do Parque, abrangendo as trilhas do Complexo Maromba, Cachoeira Poranga, Lago Azul e estrada principal (Figura 5).

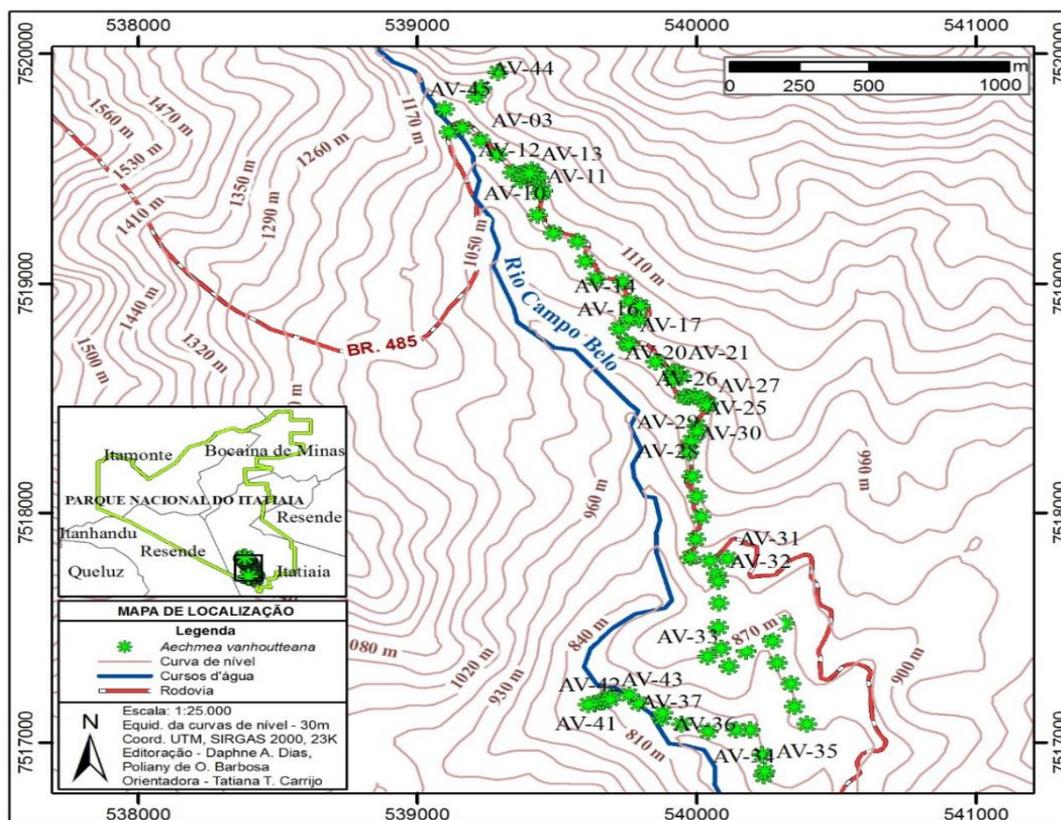


Figura 5. Disposição dos indivíduos de *Aechmea vanhoutteana* coletados na área de estudo - PNI.

Já a amostragem de *F. itatiaiae* foi realizada na parte alta do PNI e abrangeu a trilha das prateleiras, trilha da pedra da maçã/tartaruga e trilha da pedra assentada (Figura 6).

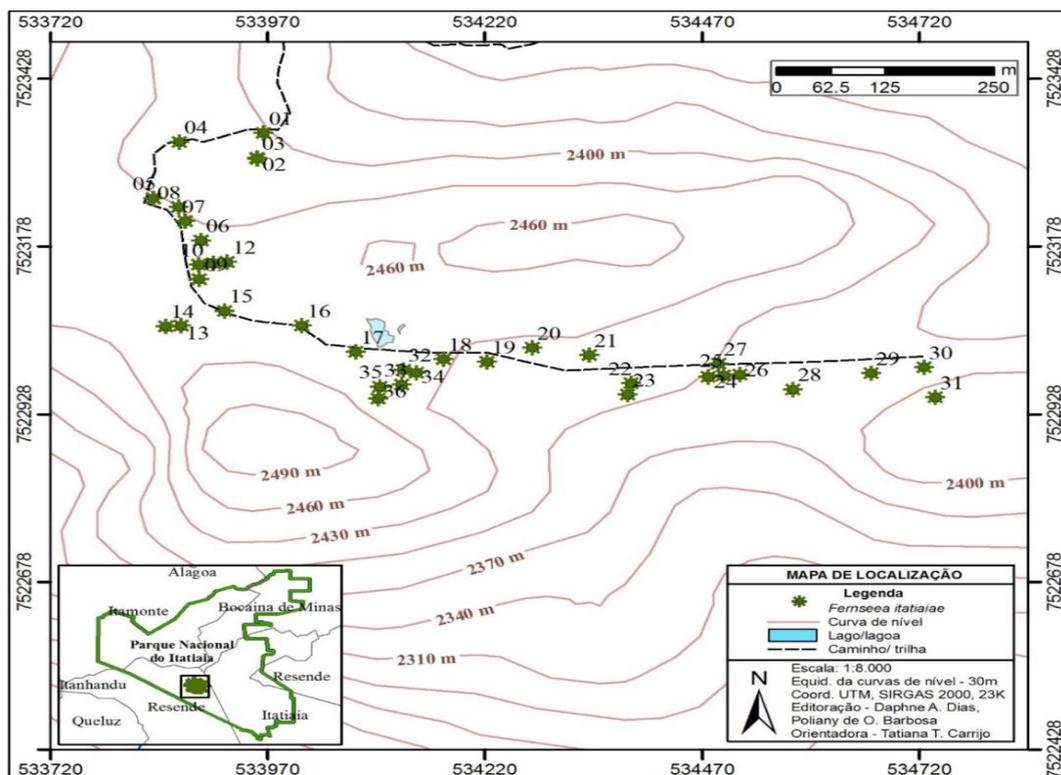


Figura 6. Disposição dos indivíduos de *Fernseea itatiaiae* coletados na área de estudo - PNI.

O primeiro ponto de amostragem para ambas as espécies foi definido com base no primeiro indivíduo encontrado ao longo das trilhas. A partir desse ponto (PB= ponto base), traçou-se uma parcela circular com cinco metros de raio e contabilizaram-se todos os indivíduos das espécies presentes nesta parcela. Como as espécies realizam reprodução vegetativa, consideraram-se como indivíduos distintos (*genets*) apenas aqueles cujas rosetas estavam desconectadas uma das outras. Após a avaliação do número de indivíduos presentes dentro do ponto base, percorreu-se 20m para cada um dos pontos cartesianos (Norte, Sul, Leste e Oeste) e em cada um desses pontos foram traçadas novas parcelas circulares com cinco metros de raio (PS=parcelas secundárias). Essas parcelas também foram avaliadas quanto à presença das espécies e quanto o número de indivíduos (*genets*). Caso a espécie estivesse presente naquela parcela secundária, percorria-se mais 20m para cada um dos pontos cardeais e traçavam-se novas parcelas secundárias, onde também foi contabilizado o número de indivíduos.

Caso não houvesse indivíduos nas parcelas secundárias, a amostragem se encerrava e volta-se ao ponto base onde se percorria mais 50m ao longo da trilha, antes de iniciar uma nova amostragem. Após esses primeiros 50m, percorria-se mais

50m procurando por novos indivíduos. Quando encontrado algum indivíduo ao longo desses 50m, marcava-se um segundo ponto base do qual novas parcelas secundárias eram traçadas. Esse processo se repetiu até não se encontrar mais nenhum indivíduo de ambas as espécies (Figura 7). Ao todo, foram amostrados 240 pontos para *A. vanhoutteana* (pontos base = 72 pontos; pontos secundários = 168) e 142 pontos para *F. itatiaiae* (pontos base = 20 pontos; pontos secundários = 124).

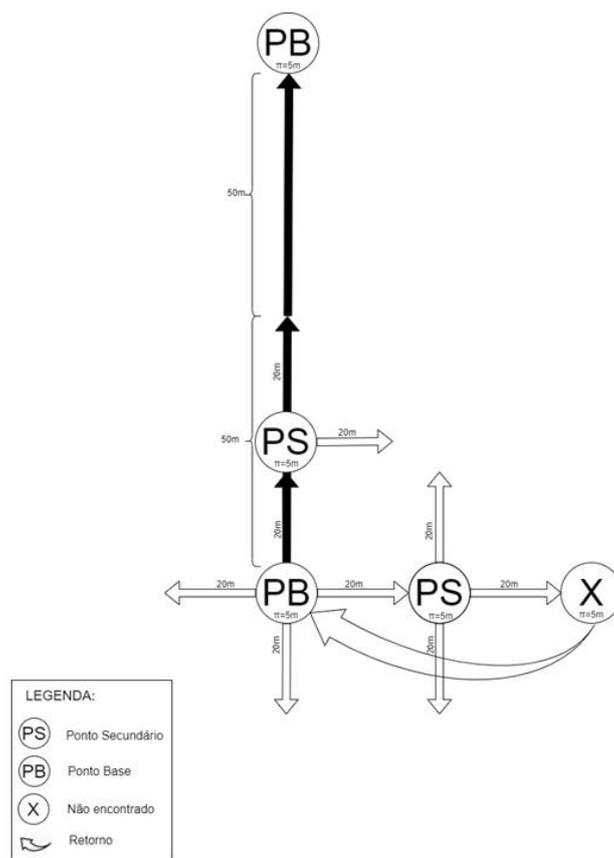


Figura 7. Esquema da amostragem adaptativa para ambas as espécies.

Dada a diversidade e complexidade dos processos envolvidos na estruturação da diversidade genética em uma população, muitas vezes é aconselhado aos pesquisadores que é preciso escolher cuidadosamente em qual escala espacial conduzir a análise. Diferentes processos ecológicos podem estar agindo simultaneamente em diferentes escalas espaciais e temporais, e podem até influenciar uns aos outros (WIDEN; CRONBERG; WIDEN, 1994, ESCUDERO; IRIONDO; TORRES, 2003).

Como as espécies possuem reprodução vegetativa, para evitar a coleta de ramets clonais do mesmo genet, apenas foi amostrado um indivíduo por forófito. Para

cada *genet*, uma porção de folha foi removido e armazenado em sílica gel antes do transporte para o laboratório, onde foi armazenado em um freezer em  $-30^{\circ}\text{C}$  até o isolamento do DNA. Ao todo foram amostrados 45 indivíduos para *A. vanhoutteana* e 71 para *F. itatiaiae*.

#### 5.4. Extração de DNA

As folhas foram coletadas e armazenadas no campo em sacos de papel contendo sílica para minimizar o processo de oxidação, que pode iniciar logo após a coleta. Em seguida, foram levadas ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, campus de Alegre. As amostras foram transferidas para sacos de alumínio e armazenadas em freezer  $-30^{\circ}\text{C}$ , por no mínimo 24 horas a fim de prepará-las para o processo de extração.

O DNA genômico total foi isolado e purificado usando o método de extração de Doyle & Doyle (1990), com modificações propostas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). O *screening* de *primers* ISSR a serem utilizados foi realizado a partir da plataforma *British Columbia University, Vancouver, Canadá*.

Ao finalizar as extrações as amostras foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific 2000C*) para identificar a pureza e as concentrações do DNA obtido. O parâmetro de pureza adotado foi a relação de absorbância 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), ideal no intervalo de 1,8 a 2,0 (BARBOSA, 1998). Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração final de  $10\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$  e armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  para serem utilizadas nas análises moleculares. O DNA estoque concentrado foi armazenado em freezer  $-30^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.5. Amplificações *Inter Simple Sequence Repeats* – ISSR

Foram testados 43 iniciadores moleculares ISSR (*University of British Columbia – UBC*) (Apêndice A) para seleção dos mais informativos. As reações de amplificação foram realizadas em placas para reações em cadeia da polimerase (PCR), para um volume final de  $20\ \mu\text{L}$ , contendo: tampão 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,5 e 50 mM de KCl), 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu\text{M}$  de *primer*, 1 unidade de Taq (Ludwig) DNA polimerase e cerca de 50ng de DNA genômico. As

amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems, com etapas de desnaturação a 94°C, por 5min, seguida de 35 ciclos de 94°C, por 45s, anelamento de 52°C, por 45s, e 72°C, por 90s, com extensão final de 72°C, por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 2%, com tampão TBE 1X (10,8 g/L Tris-base; 5,5 g/L Ácido Bórico; 0,83 g/L EDTA e água osmose) numa voltagem de 100 Volts, por 4 horas. Após a separação dos fragmentos, os géis foram submersos em um banho contendo solução de brometo de etídio (0,50 µg/mL) durante 30 min, sendo em seguida fotografados sob luz UV em fotodocumentador (ChemiDoc MP *Imaging System* – Bio Rad), permitindo a distinção entre presença e ausência de bandas, além do tamanho dos fragmentos com auxílio do marcador de peso molecular *Ladder* 100bp.

## 5.6. Análise dos dados moleculares

O registro de dados moleculares foi realizado a partir de uma análise visual das bandas monomórficas e polimórficas inequívocas, codificadas como ausente (0) ou presente (1). Bandas na mesma posição para todos os indivíduos foram consideradas bandas monomórficas, enquanto bandas com posições em alturas diferentes foram consideradas polimórficas. Posterior a essa etapa foi realizada uma análise descritiva dos dados, resultando em valores como número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por marcador e a faixa de variação no tamanho dos lócus amplificados (TPB), em pares de bases. Para dados perdidos foram atribuídos valores e símbolos de acordo com a exigência de cada programa estatístico.

Foram obtidos os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada loco de ISSR e para isso utilizou-se o cálculo proposto por Roldan-Ruiz e colaboradores (2000),:

$$PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$$

Em que:

$PIC_i$  = O conteúdo de informação polimórfica do marcador  $i$ ;

$f_i$  = A frequência dos fragmentos presentes na amostra;

$1 - f_i$  = A frequência dos fragmentos ausentes.

A dissimilaridade genética intrapopulacional foi estimada através do Complemento Aritmético do Índice de Jaccard (JACCARD, 1901, SNEATH; SOKAL, 1973), utilizando o programa Genes (CRUZ, 2008). Esse índice representa a razão entre o número de coincidências e o número total de bandas, excluindo a coincidência negativa (d), sendo:

$$S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

Em que:

a = Número de coincidências do tipo 1 – 1 para cada par de indivíduos;

b = Número de discordâncias do tipo 1 – 0 para cada par de indivíduos;

c = Número de discordâncias do tipo 0 – 1 para cada par de indivíduos;

Os valores encontrados foram utilizados na análise de agrupamento, pois a dissimilaridade (D) entre os indivíduos par a par é gerada a partir da similaridade, sendo  $D = 1 - S$ . Dessa forma, os valores da dissimilaridade entre os indivíduos foram utilizados na análise de agrupamento, por meio do método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (*Unweighted Pair Group Method Average - UPGMA*) para obtenção dos dendrogramas.

Para o método de análise de agrupamento por meio do UPGMA, faz-se necessária a realização do cálculo do ponto de corte, que é estimado pelo método de Mojena (1977), cuja fórmula é descrita como:

$$P_c = m + kdp$$

Onde:

M = a média dos valores de distância dos níveis de fusão correspondentes aos estádios;

k = 1,25 (MILLIGAN; COOPER, 1985);

dp = desvio padrão que determinará a semelhança e divergência molecular entre os indivíduos, além da formação de grupos geneticamente distintos.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi calculado para verificar a consistência dos agrupamentos realizados pelo método UPGMA, ou seja, o ajuste entre as medidas de dissimilaridades originais e as geradas graficamente (SOKAL;

ROHLF, 1962). Todas estas análises foram realizadas utilizando o programa GENES (CRUZ, 2013).

Os dados genéticos também foram utilizados para produzir uma matriz de distância genética a partir do estimador da distância genética de Nei (H') (1973), bem como o índice de Shannon (I) (SHANNON; WEAVER, 1949), sendo todos calculados no aplicativo Popgene 3.2 (YEH; DOYLE, 1997). Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade: porcentagem de locos polimórficos (PLP), número de alelos observados (Na), número de alelos efetivos (Ne), e a porcentagem de loci polimórfico (P). A estrutura populacional foi avaliada por simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), utilizando os genótipos multilocus dos indivíduos amostrados para detecção de grupos genéticos prováveis (K). Foram realizadas 20 corridas para cada valor de K, onde o número de grupos estabelecidos (K) foi de K= 1 a K= 4, com 7.500 interações de Monte Carlo, via Cadeias de Markov (MCMC) com um descarte inicial (*burn-in*) de 2.500 interações por meio do programa Structure 2.3.4.

Como cada espécie coletada possui apenas uma população, faz-se necessário, portanto, a verificação do número de grupos mais provável. Esses grupos genéticos foram estimados pelo método “*ad hoc*”  $\Delta K$  proposto por Evanno; Regnaut e Goudet (2005), usando o software Structure Harvester (EARLI; VONHOLDT, 2012). Ao assumir valores de K nos intervalos de 1 a 4, pressupõe-se que o K real é 1 (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Neste caso, a definição do valor de K mais provável para os agregados genéticos, foi estimada com base na média e no desvio padrão de cada valor de probabilidade de K, logaritmo neperiano da probabilidade [LnP(K)].

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Seleção dos *primers* ISSR para *Fernseea itatiaiae*

Dos 43 marcadores ISSR testados para *Fernseea itatiaiae*, 11 iniciadores possibilitaram a obtenção de 171 fragmentos amplificados, dos quais 155 foram polimórficos (89,8%). Todos os marcadores apresentaram polimorfismo acima de 82% e o número de bandas polimórficas variou de 7 (UBC 855) a 20 (UBC 840), com média de 14 por marcador. O tamanho dos fragmentos variou entre 200 a 2100 pares

de bases. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador variou entre 0,17 (UBC 836, 868) a 0,30 (UBC 840) com média de 0,23 (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* ISSR selecionados para *F. itatiaiae* incluindo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer*, faixa de variação de tamanho dos locos em pares de bases (TPB).

<i>Primer</i>	NTB	NBP	PBP (%)	TPB (mín-máx.)	PIC (média)
UBC 808	20	19	95,0	280-2000	0,25
UBC 810	12	10	83,3	500-1600	0,23
UBC 812	17	14	82,3	350-1650	0,27
UBC 815	13	12	92,3	500-2100	0,30
UBC 822	13	11	84,6	450-2000	0,24
UBC 834	17	16	94,1	330-1500	0,22
UBC 836	13	11	84,6	200-1550	0,17
UBC 840	21	20	95,2	300-1600	0,24
UBC 842	18	17	94,4	230-1500	0,23
UBC 855	8	7	87,5	780-2100	0,21
UBC 868	19	18	94,7	400-2100	0,17
<b>TOTAL</b>	<b>171</b>	<b>155</b>	<b>89,8</b>	-	<b>0,23</b>

A Figura 8 exemplifica o perfil de amplificação com o *primer* UBC 840 em 71 indivíduos para demonstração do padrão dos fragmentos obtido.

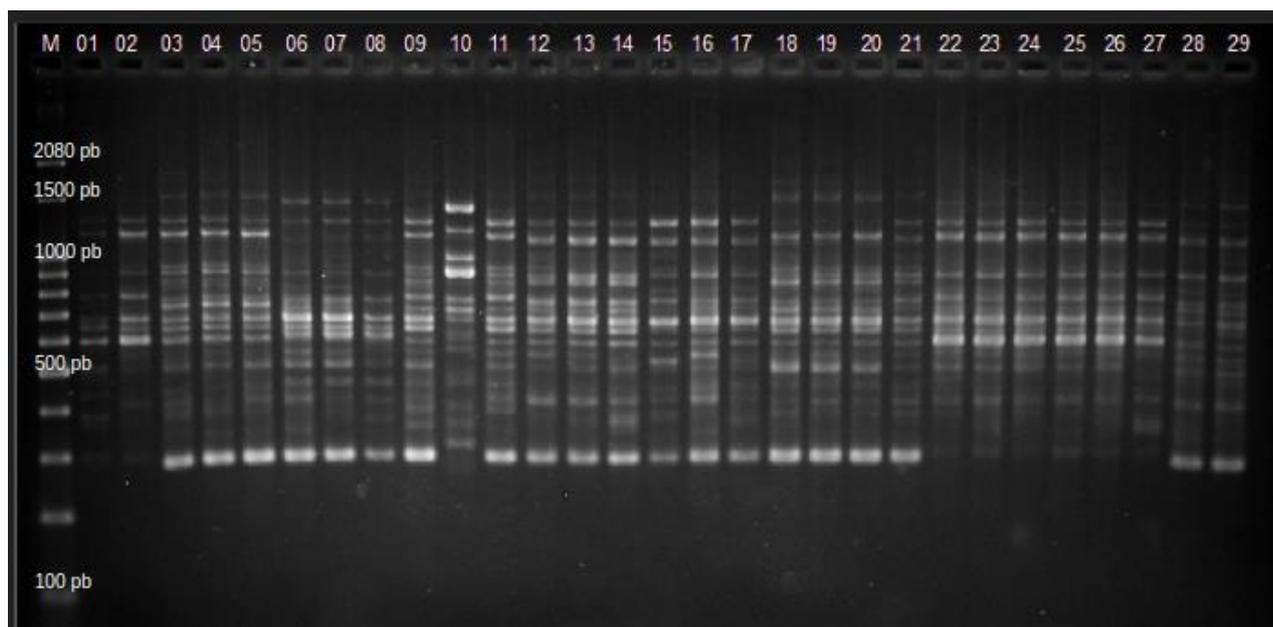


Figura 8. Perfil eletroforético demonstrado em gel de agarose a 2% produzido pelo *primer* UBC 840 em 29 indivíduos de *Fernseea itatiaiae*. M – Marcador de peso molecular (*Ladder* 100pb).

## 6.2. Estrutura e diversidade genética em *Fernseea itatiaiae*

A dissimilaridade entre os 71 indivíduos de *Fernseea itatiaiae* foi mensurada a partir da análise de 309 *loci*, e resultou em uma média de 0,37.

A partir da dissimilaridade entre os indivíduos foi gerado o agrupamento por UPGMA que revelou sete grupos (Figura 9) em que a maioria dos indivíduos se agrupou segundo a sua origem.

O par 9 x 68 apresentou o maior valor de dissimilaridade genética (0,8876), enquanto o par 32 x 33 foi o menor, com valor igual a 0,8182.

O ponto de corte recomendado seguindo o método de Mojena (1977), foi de 74% para *Fernseea itatiaiae*. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi de 90%. Para os parâmetros de diversidade genética, o número médio de alelos observados ( $N_a$ ) foi igual a 1,92, e o número de alelos efetivos ( $N_e$ ) foi igual a 1,37. A diversidade genética de Nei ( $H'$ ) e o índice de Shannon ( $I$ ), assumindo que a população estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram de 0,23 e 0,36,

respectivamente. O número mais provável de K agrupamentos foi definido como dois (K= 2) pelo programa Structure (Figura 10).

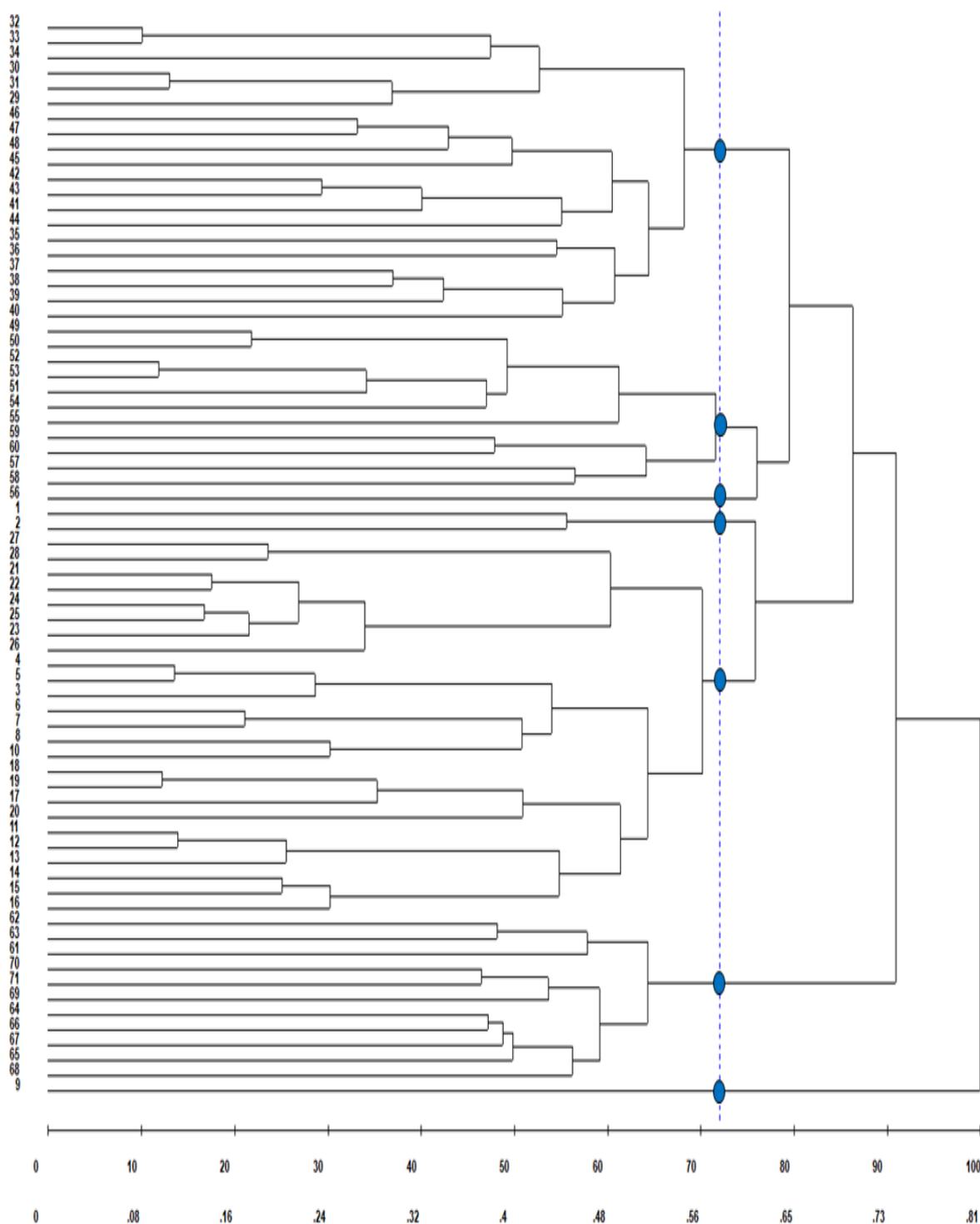


Figura 9. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método UPGMA no programa GENES, para 71 indivíduos de *Fernseea itatiaiae*, formando 7 grupos em toda a amostragem populacional. Ponto de Corte (PC): 74%.

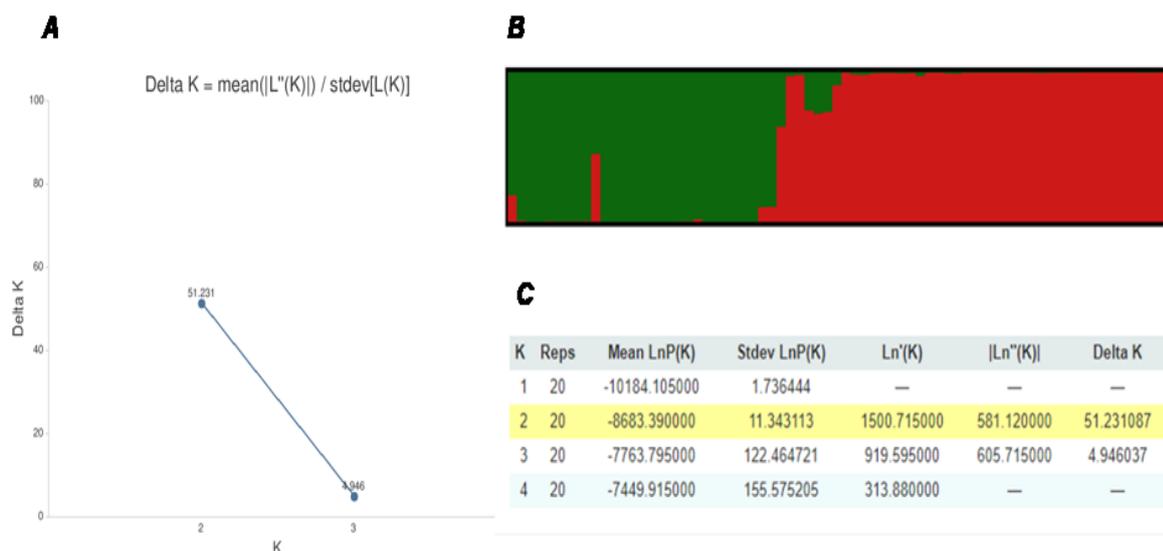


Figura 10. Abordagem Bayesiana (software Structure) de 71 indivíduos de *F. itatiaiae* ocorrentes na parte alta do PNI. A - Gráfico da média  $\pm$  o desvio padrão de LnP (K). B - Gráfico identificando o número de agrupamentos, indicando  $k=2$ . C - Saída de dados do método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) usando o software Structure Harvester, indicando a média  $\pm$  o desvio padrão de LnP (K).

### 6.3. Seleção dos *primers* ISSR *Aechmea vanhoutteana*

Dos 43 marcadores ISSR testados para *Aechmea vanhoutteana*, 15 *primers* possibilitaram a obtenção de 235 fragmentos, dos quais 219 foram polimórficos (92,8%). Todos os marcadores apresentaram polimorfismo acima de 87% e o número de bandas polimórficas variou de 10 (UBC 827) a 24 (UBC 807) bandas, com média de 14,6 bandas polimórficas por marcador e o tamanho dos fragmentos variou entre 170 a 2100 pares de bases.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador variou entre 0,14 (UBC 808) a 0,29 (UBC 840) com média de 0,20 (Tabela 2).

A figura 11 exemplifica o perfil de amplificação com o *primer* UBC 861 em 45 indivíduos, para demonstrar o padrão dos fragmentos obtidos.

Tabela 2. *Primers* ISSR selecionados para *A. vanhoutteana* incluindo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer*, faixa de variação de tamanho dos loci em pares de bases (TPB).

<b>Primer</b>	<b>NTB</b>	<b>NBP</b>	<b>PBP (%)</b>	<b>TPB (mín-máx.)</b>	<b>PIC (média)</b>
UBC 807	25	24	96,0	170-2080	0,19
UBC 808	17	16	94,1	300-2080	0,14
UBC 809	18	17	94,4	300-1600	0,16
UBC 810	22	21	95,4	450-1600	0,14
UBC 811	13	12	92,3	250-2080	0,15
UBC 812	13	12	92,3	250-2000	0,27
UBC 822	14	13	92,8	400-2080	0,27
UBC 827	11	10	90,9	500-2100	0,25
UBC 834	12	11	91,6	300-1400	0,22
UBC 836	15	14	93,3	350-1700	0,20
UBC 840	14	13	92,8	300-1600	0,29
UBC 842	16	15	93,7	200-1500	0,22
UBC 855	12	11	91,6	390-2080	0,16
UBC 861	16	14	87,5	250-2080	0,18
UBC 868	17	16	94,1	300-2100	0,21
<b>TOTAL</b>	<b>235</b>	<b>219</b>	<b>92,8</b>	-	<b>0,20</b>

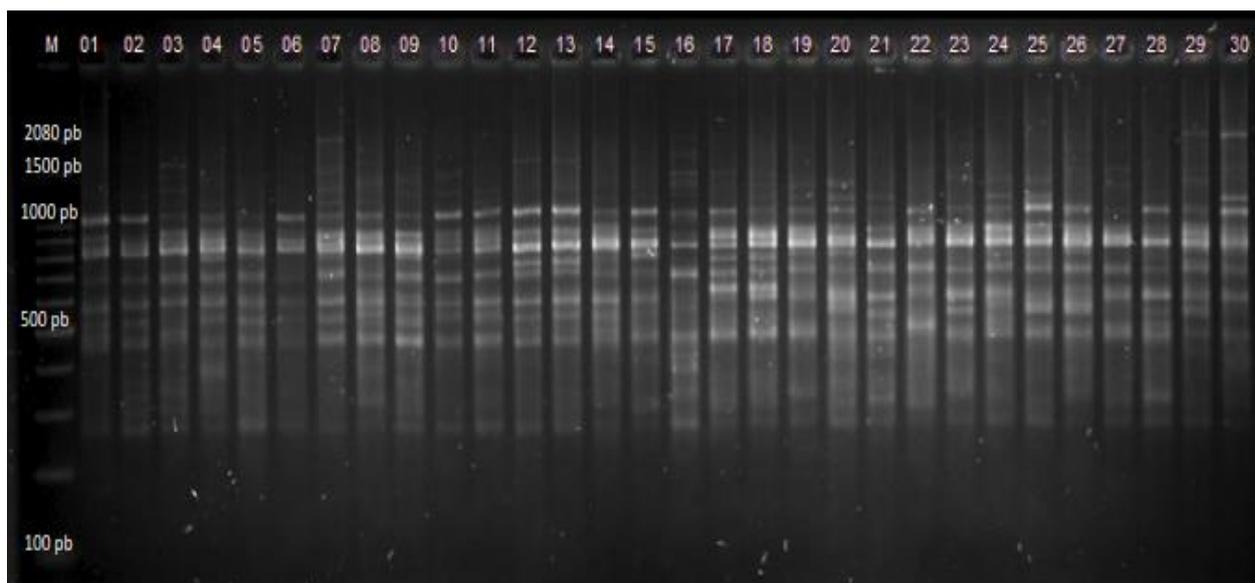


Figura 11. Perfil eletroforético demonstrado em gel de agarose a 2% produzido pelo primer UBC 861 em 30 indivíduos de *A. vanhoutteana*. M – Marcador de peso molecular (Ladder 100pb).

#### 6.4. Estrutura e Diversidade Genética de *Aechmea vanhoutteana*

A dissimilaridade dos 45 indivíduos de *A. vanhoutteana* foi mensurada a partir da análise de 434 locos, resultando em uma média de 0,66. A partir da dissimilaridade entre os indivíduos foi gerado o agrupamento por UPGMA (Figura 12), demonstrando 4 grupos.

O par 1 x 2 apresentou o maior valor de dissimilaridade genética, sendo igual a 1,0, enquanto o par 11 x 12 apresentou o menor valor, 0,3158. O ponto de corte recomendado pelo método de Mojena (1977), foi de 81%.

Para os parâmetros de diversidade genética, o número médio de alelos observados ( $N_a$ ) foi igual a 1,98, e o número de alelos efetivos ( $N_e$ ) foi igual a 1,28.

A diversidade genética de Nei ( $H'$ ) e o índice de Shannon ( $I$ ), assumindo que a população estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentaram valores de 0,19 e 0,34, respectivamente.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi de 91%. O número mais provável de  $K$  agrupamentos foi definido como três ( $K = 3$ ) (Figura 13).

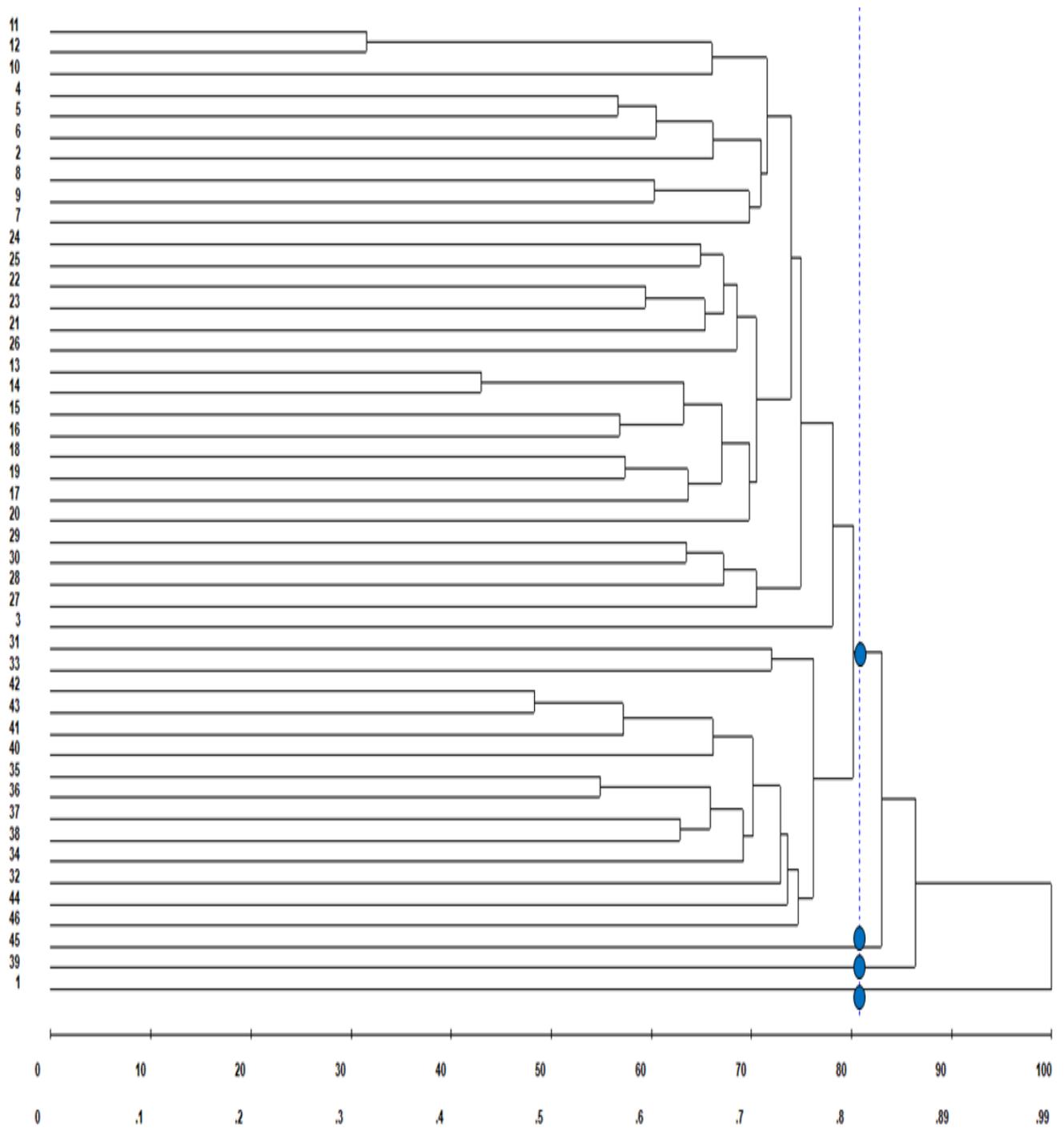


Figura 12. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método UPGMA no programa GENES, para 45 indivíduos de *Aechmea vanhoutteana*, formando 4 grupos em toda a amostragem populacional. Ponto de Corte (PC): 81%.

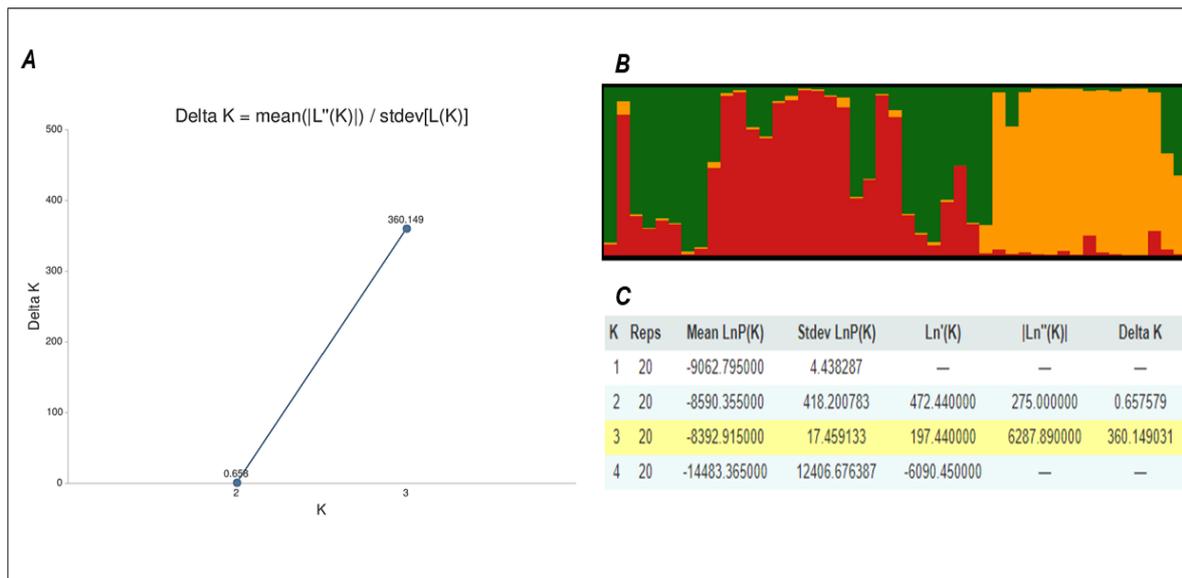


Figura 13. Abordagem Bayesiana (software Structure) de 45 indivíduos de *A. vanhoutteana* ocorrentes na parte baixa do PNI. A - Gráfico da média  $\pm$  o desvio padrão de LnP (K). B - Gráfico identificando o número de agrupamentos, indicando  $k=3$ . C - Saída de dados do método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) usando o software Structure Harvester, indicando a média  $\pm$  o desvio padrão de LnP(K).

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Estrutura e diversidade Genética

A porcentagem dos loci polimórficos é um dos métodos mais utilizados para a determinação da diversidade genética contida nas populações (CRUZ *et al.*, 2011). Análises genéticas utilizando marcadores dominantes como os ISSR podem apresentar número de locos variando de acordo com a espécie estudada, conforme discutem Gois e colaboradores (2014). Essa diferença pode ser vista em *Fernseea itatiaiae*, pois os 11 marcadores utilizados possibilitaram a obtenção de 171 fragmentos amplificados, dos quais 155 foram polimórficos. Todos os marcadores apresentaram polimorfismo acima de 82%, com média de 14 bandas polimórficas por marcador. Para *Aechmea vanhoutteana*, foi possível a obtenção de 235 fragmentos amplificados a partir de 15 marcadores ISSR, dos quais 219 foram polimórficos (92,8%). A proporção de polimorfismo para a maioria das monocotiledôneas é em torno de 40,3% segundo Murawski e Hamrick (1990). No entanto, percebe-se que na leitura que foi realizada para Bromeliaceae, todos os marcadores apresentaram polimorfismo acima de 80%. Como apresentado nesse trabalho, o percentual de bandas polimórficas encontradas com os 11 marcadores ISSR usados para *F.*

*itatiaiae* e 15 para *A. vanhoutteana* foi acima do esperado. O número de locos gerados nesse estudo é, portanto, comparável ao encontrado em outros trabalhos, sendo considerado suficiente para quantificar e discriminar os genótipos. Os valores de PIC, por sua vez, contribuíram na análise dos dados pois ele é mais adequado para estimar a diversidade ampla em uma população.

As análises estatísticas referentes ao grau de dissimilaridade genética entre os pares de indivíduos de uma espécie servem para verificar dados importantes sobre a estrutura genética da população (CRUZ, 2011). Por isso, lançou-se mão do uso dos índices de dissimilaridade obtidos por meio da complementaridade do coeficiente de Jaccard para comparar a diversidade genética entre os indivíduos das espécies estudadas, em análises separadas. Através do uso da matriz de dissimilaridade foi possível observar os ajustes dos dados ao dendrograma em todas as análises, sabendo-se que indivíduos com menor distância pertencem ao mesmo agrupamento e aqueles com maior distância pertencem a agrupamentos diferentes.

Para Rohlf e Fisher (1968), o coeficiente de correlação cofenética deve apresentar valores acima de 0,8. O ajuste pode ser confirmado pelo alto valor do coeficiente de correlação cofenética para *F. itatiaiae*, sendo 0,9 (CCC= 90%) e *A. vanhoutteana*, 0,91 (CCC= 91%). Vaz Patto e colaboradores (2004) corroboram o que estes autores falam, relatando que valores maiores ou iguais a 56% são ideais, pois demonstram boa concordância com os valores de dissimilaridade genética.

A análise de agrupamento revelou sete grupos (UPGMA) para *Fernseea itatiaiae*, sendo que o grupo 7 se destacou pela alta dissimilaridade genética quando comparado aos demais. O maior grupo (5) reuniu 25 indivíduos.

A mesma análise revelou quatro grupos para *Aechmea vanhoutteana*, dentre os quais o grupo 1 se destacou pela maior quantidade de indivíduos (42 no total). Essas estimativas de dissimilaridade entre os pares de indivíduos são importantes, pois permitem avaliar a heterogeneidade das amostras (LINDEN, 2009; CRUZ, 2011), refletindo a existência de variabilidade entre os indivíduos estudados de ambas as espécies.

Botstein e colaboradores (1980), foram os primeiros autores a descreverem os valores de PIC. Seu resultado tem relação com a qualidade do marcador em estudos genéticos e expressa sua capacidade em detectar variabilidade entre os indivíduos. Ou seja, demonstra a probabilidade de ele aparecer em dois estados, sendo elas a presença ou a ausência. Os autores relatam que iniciadores que refletem valores de

PIC superiores a 0,5 são classificados como altamente informativos, enquanto os valores entre 0,25 e 0,5 são mediamente informativos e aqueles com valores inferiores a 0,25 são considerados pouco informativos. Seguindo esse critério, os iniciadores utilizados neste estudo podem ser classificados como pouco informativo, pois apresentaram o PIC para *F. itatiaiae* variando entre 0,17 (UBC 868) a 0,30 (UBC 840) com média de 0,23, e para *A. vanhoutteana* entre 0,14 (UBC 808) a 0,29 (UBC 840) com uma média de 0,20. Entretanto, deve-se ressaltar que, conforme abordam Roldan-Ruiz e colaboradores (2000), (ver TATIKONDA, 2009), os marcadores dominantes têm a tendência de apresentarem menores valores de PIC, devido ao seu caráter bialélico, explicando esse resultado.

O gráfico do Structure e o dendrograma por UPGMA além de demonstrarem a formação de dois grupos para *F. itatiaiae*, e três grupos para *A. vanhoutteana*, discriminaram os indivíduos mais semelhantes. Para a confirmação dos resultados da estruturação da população, foi realizada uma análise chamada estatística  $\Delta K$  (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005), sendo verificado  $K=2$  para *F. itatiaiae* e  $K=3$  para *A. vanhoutteana*. As diferentes cores atribuídas aos grupos revelam a proporção de ancestralidade dos genótipos e indicam que as características genéticas estão sendo compartilhadas entre os indivíduos (PRITCHARD; WEN, 2002). É notório que em termos de genoma, visualmente a espécie *F. itatiaiae* apresenta maior contribuição de um grupo (representado pela cor vermelha), enquanto *Aechmea vanhoutteana* apresentou uma maior participação de grupo (representado pelas cores vermelha e amarela), deixando essa população geneticamente estruturada em grupos distintos, mas que ainda apresentam troca de alelos dentro da população.

Os valores de diversidade genética de Nei ( $H'$ ) e índice de Shannon ( $I'$ ) encontrados para *F. itatiaiae* foi de ( $H'=0,23$ ) e ( $I'=0,36$ ) respectivamente, e para *A. vanhoutteana* foram encontrados valores de Nei ( $H'=0,19$ ) e índice de Shannon ( $I'=0,33$ ). Tanto para *A. vanhoutteana* quanto para *F. itatiaiae* os valores estavam mais próximo de zero, pois os índices variam de 0 – 1 (quanto mais próximo de 0 menor é a diversidade genética intrapopulacional adaptado para genética de populações naturais) (BARREIRA-SÁNCHEZ, 2008), resultando então em uma baixa diversidade genética populacional quando comparada às outras espécies de bromélias. Valores similares aos encontrados nesse estudo foram encontrados por Ribeiro e colaboradores (2013), no estudo de *Vriesea cacuminis* L.B.S, com valores do índice de Shannon entre 0,29 a 0,31.

Outros resultados encontrados por diferentes autores também podem servir de base, pois foram realizados com metodologias semelhantes como, por exemplo, o estudo de *Piticainia flammea* (L.) John por Souza-Sobreira e colaboradores (2015), por valores de Shannon variaram entre 0,34 a 0,46. Almeida e colaboradores (2012), quando avaliou a espécie *A. fulgens* utilizando oito marcadores ISSR, observaram valores de Shannon entre 0,51 a 0,56, demonstrando uma diversidade genética moderada. Resultado semelhante foi encontrado por Ribeiro (2017), com *A. blanchetiana* no norte do estado do Espírito Santo, em que a base dos valores do índice de Shannon ( $I = 0,58$ ) e de Nei ( $H' = 0,41$ ) indica moderada diversidade genética para as populações estudadas. A baixa diversidade genética encontrada pode ser reflexo de fatores, tais como deriva genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Inicialmente, quando se observa a estruturação em dois grupos genéticos na população de *F. itatiaiae* e de três grupos em *A. vanhoutteana*, com a baixa diversidade genética e o alto polimorfismo, pode parecer que os dados são conflitantes. No entanto, isso pode ser explicado pela troca de alelos favorecida por apenas uma parte dos indivíduos em cada população, separadamente. A variabilidade genética intrapopulacional é reflexo da interação entre diversos processos, tais como distribuição geográfica, fragmentação e isolamento das populações, sistema reprodutivo, mutação, deriva genética, polinização e dispersão (NYBOM; BARTISH, 2000), e esses fatores podem resultar em um aumento da similaridade genética entre os indivíduos dentro de uma mesma população, podendo causar uma baixa diversidade genética ainda que o grau de polimorfismo seja alto, pois a diversidade genética está relacionada com o número de alelos e como eles estão distribuídos na população. Quanto maior o número de alelos e melhor estiverem distribuídos, maior a diversidade genética. Nesse caso podemos entender que não há muitos alelos diferentes e que eles não estão bem distribuídos, causando assim uma baixa diversidade.

Para Ribeiro e colaboradores (2013), Souza-Sobreira e colaboradores (2015), Almeida e colaboradores (2012), e Ribeiro (2017), tanto o número de *primers* quanto a porcentagem de polimorfismo encontrado para as espécies foram considerados suficientes para avaliar e quantificar a diversidade genética. Da mesma forma, os marcadores moleculares ISSR utilizados nesse estudo mostraram eficiência em detectar polimorfismo tanto para *F. itatiaiae* quanto para *A. vanhoutteana*.

Deve-se levar em consideração que mesmo que as bromélias sejam polinizadas por espécies que possuam uma faixa de voo considerada grande, alguma alteração no habitat, por exemplo a fragmentação pode limitar os movimentos dos polinizadores a longa distância, (LAURANCE *et al.*, 2002). Além disso, a maioria das espécies apresenta propagação clonal. Matallana e colaboradores (2010), citam que a autocompatibilidade do sistema de reprodução pode ser comum em algumas espécies de bromélias, mesmo podendo levar a perda de diversidade genética e redução do potencial adaptativo das espécies quando enfrentam condições adversas (GALEUCHET; PERRET; FISCHER, 2005). Este aspecto é importante, dado que populações pequenas e isoladas são fortemente influenciadas pela deriva genética (SEBBENN *et al.*, 2011, PENCE, 2016).

Sobre a reprodução assexuada, mesmo que ela dê origem à clones, situação que aparentemente é desvantajosa sob o ponto de vista genético e de perpetuação das espécies, ela pode representar vantagem para o desenvolvimento das plantas em ambientes estáveis, onde a alta competição de indivíduos estabilizados é maior em detrimento dos jovens recém-chegados (GRIME, 1979). Esse tipo de reprodução pode ser uma estratégia de algumas bromélias, podendo ser o caso das espécies estudadas, pois em certas condições ecológicas, uma maior propagação horizontal por meio de rametes, talvez seja interessante, ainda que isso afete a distribuição espacial dos *genets*, influenciando os níveis de dispersão e a estrutura populacional (LOH *et al.*, 2015). Este fato também pode justificar a baixa diversidade genética encontrada nas espécies estudadas.

Atualmente, estima-se que apenas 6% da Mata Atlântica esteja protegida por Unidades de Conservação (CAMPANILI; SCHAFFER, 2010). Por isso, é importante ressaltar que as áreas escolhidas para se tornarem Unidades de Conservação, muitas vezes estão localizadas em regiões com menor biodiversidade do que áreas externas a elas (TERBORGH; VAN SCHAİK, 2002). Portanto, a conservação de algumas populações de uma determinada espécie por um UC, pode não significar a conservação total da sua diversidade genética (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017). Principalmente se considerar que a baixa diversidade para ambas as espécies pode ser devido a situação da qualidade do hábitat em que elas estão inseridas. Tanto *Fernseea itatiaiae* quanto *Aechmea vanhoutteana* estão em áreas que ocorrem incêndios quase anuais, podendo prejudicar a sobrevivência das espécies, resultando até em um possível declínio contínuo da qualidade do hábitat, mesmo dentro de

unidades de conservação (CNC Flora, 2020). Neste contexto enquadra-se o que Ghanzoul (2005), discute quando diz que uma alteração no ecossistema pode afetar o comportamento dos animais dispersores de pólen e sementes, interferindo diretamente na estrutura genética das populações. Tornando essencial o entendimento sobre o local em que a espécie está inserida e como outros fatores (por exemplo, a polinização e dispersão) podem ser afetadas ou afetar a diversidade genética da população.

Este parece ser o caso das espécies estudadas. Segundo o que foi postulado pela teoria da genética de populações, é de se esperar que espécies localmente endêmicas e com distribuição restrita a poucas localidades, apresentem índices menores de diversidade genética quando comparadas às espécies de ampla distribuição e com populações maiores (FRANKHAM *et al.*, 2003).

Apesar de ambas as espécies estudadas possuírem baixa diversidade genética, entende-se que a integração das informações relativas aos níveis dessa diversidade em uma população subsidia ações para a manutenção da diversidade genética naquele ambiente permitindo uma caracterização efetiva da dinâmica populacional em ambientes naturais favorecendo sua conservação.

## **8. CONCLUSÃO**

Com base nos marcadores genéticos utilizados, as populações de *Aechmea vanhoutteana* e *Fernseea itatiaiae* localizadas dentro dos limites do Parque Nacional do Itatiaia, apresentam baixa diversidade genética. Ambas as espécies demonstraram consistente estruturação genética, indicando a formação de dois grupos para *F. itatiaiae* e três grupos para *A. vanhoutteana*. A conservação de ambas as espécies estudadas demanda, portanto, a proteção de populações ocorrentes nas regiões limítrofes da Unidade de Conservação estudada, ou em outras localidades de ocorrência das espécies.

## 9. REFERÊNCIAS

ABREU, A. G.; *et al.* Genetic diversity and age class structure of seedlings and saplings after a mast flowering of bamboo in the Brazilian Atlantic forest. **International Journal of Plant Sciences**, v. 175, p. 319–327, 2014.

ALMEIDA, C.M.A. **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. 2006.

ALMEIDA, C.M.A. *et al.* Genetic Diversity in *Aechmea fulgens* (Bromeliaceae: Bromelioideae) Revealed by Molecular Markers. **Genetic Diversity In Plants**, 14 mar. 2012.

ALVES, G.M., *et al.* 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. 2004.

ANSARI, S. A. *et al.* ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* Lf) populations. **Annals of Forest Research**, v. 55, n. 1, p. 11-23, 2012.

AOKI-GONÇALVES, F., *et al.* Microsatellite loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to neotropical rock outcrops. **Applications in Plant Sciences** 2:1300073. 2014.

AVISE, J. **Molecular markers, natural history, and evolution.** Sunderland (Mass.): Sinauer. 2004.

AXIMOFF, I. O que perdemos com a passagem do fogo pelos campos de altitude do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Biodiversidade Brasileira**, Número Temático: Ecologia e Manejo do Fogo em Áreas Protegidas. 2: 180-200. 2011.

AXIMOFF, I.A; ALVES, R.G; RODRIGUES, R.C. **Campos de altitude do Itatiaia: Aspectos ambientais, Biológicos e Ecológicos.** Boletim número 18. 2014.

BARBARÁ, T., *et al.* Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Molecular Ecology** 16: 1981-1992. 2007a.

BARBARÁ, T., *et al.* Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). **Annals of Botany** 103: 65-77. 2009.

BARBOSA, M. M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas.** Porto Alegre. 99-106p. 1998.

BARRERA SÁNCHEZ, C.F. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

BEKESSY, S.A., *et al.* Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. **Heredity**, v.88, p.243-249, 2002.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**, Cambridge University Press Cambridge, UK. p.690, 2000.

BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP. FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** 66: 1085-1113. 2015.

BFG - The Brazil Flora Group Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia** 69: 1513-1527.2018.

BOISSELIER-DUBAYLE, M.C. *et al.* Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana – a test of the forest refuge hypothesis. **Ecography** 33: 175-184. 2010.

BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, v. 32, p. 314- 331. 1980.

BONEH, L.; KUPERUS, P.; VAN TIENDEREN, H. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. **Molecular Ecology Notes**, n.3, p.302-303. 2003.

BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209–215, 2001.

BOUZAT, J.L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. **Biological Conservation**, v.99, p.277-284, 2001.

BRASIL. **Decreto nº 23.793, de 23 de janeiro de 1934**. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1930-1949/d23793.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/d23793.htm). Acesso em 05 de mai. de 2020.

BRASIL. **Decreto nº 87.586, de 20 de setembro de 1982**. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1980-1987/decreto-87586-20-setembro-1982-437906-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em 05 de mai. de 2020.

BRASIL. **LEI nº 9.985, DE 18 DE JULHO DE 2000**. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9985.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9985.htm).

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata Atlântica: Manual de adequação ambiental**. Brasília: Ministério do meio ambiente; Secretaria de biodiversidade e florestas, 96p. 2010.

CASCANTE-MARÍN, A., *et al.* Genetic diversity and reproductive biology of the dioecious and epiphytic bromeliad *Aechmea mariae-reginae* (Bromeliaceae) in Costa Rica: implications for its conservation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 4, p. 773-786, 2020.

CARLIER, J.D. *et al.* A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) including SCAR, CAPS, SSR and EST-SSR markers. **Molecular Breeding** 29: 245–260. 2012.

CAVALLARI, M.M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação.** 2004. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CAVALLARI, M.M., FORZZA, R.C., VEASEY, E.A., ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Epinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. **Biodivers Conserv** 15: 4357-4373. 2006.

CAVERS, S. *et al.* Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, v.95, p.281-289, 2005.

CARVALHO, M. B. **Diversidade genética da *Vriesea botafogensis* Mez (Bromeliaceae): uma espécie endêmica de inselbergs ameaçada de extinção.** 2015.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA – CNCFlora. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>. Acesso em 01 fev. 2020.

CHAGAS, K. P. T. *et al.* Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, 2015.

CHEN, H.C., *et al.* Genetic relationship between ornamental bromeliads of Centric South America and commercial cultivars in Taiwan. **Journal of the Chinese Society for Horticultural Science**, v.48, n.3, p.201-210, 2002.

COATES, D.J., ATKINS, K.A. Priority setting and the conservation of Western Australia's diverse and highly endemic flora. **Biological Conservation**, v.97, p.251-263. 2001.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 124 p. 2004.

CORTESI, P. *et al.* Genetic similarity of flag shoot and ascospore subpopulations of *Erysiphe necator* in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**. 71:7788–7791. 2005.

CRAYN, D.M.; WINTER, K.; SMITH, A.C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 101: 3703-3708. 2004.

CRUZ, C.D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum** 35: 271-276. 2008.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, n.3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1a ed. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema, 2011. 620 p.

DE FARIA, A. P. G.; WENDT, T.; BROWN, G. K. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 303-319, 2004.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15. 1990.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology Notes**, v.14, p. 2611–2620, 2005.

ESCUADERO, A.; IRIONDO, J. M.; TORRES, M. E. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biological Conservation**, v. 113, n. 3, p. 351–365, 2003.

FISHER, R.A. The genetical theory of natural selection. **Oxford: Clarendon Press** 1930. 272p.

FISCHER, M., *et al.* RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, v.87, p.1128-1137, 2000.

FLEISHMAN, E., *et al.* Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservation**, v.98, p.45-53, 2001.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >.

FRANKHAM, *et al.* Introduction to conservation genetics. 2nd edition. **Cambridge University Press**, Cambridge, 617 pp. 2003.

FRANKHAM, R. *et al.* Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 280 p. 2008.

GALEUCHET, D. J; PERRET, C; FISCHER, M. Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented 51 landscape. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 4, p.991-1000, 2005. Wiley-Blackwell.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V. L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadoni* (Orchidaceae) assed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**. v.11, n.96, p.2022-2030, 2009.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 413-443, 2005.

GITZENDANNER, M.A. *et al.*. 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. 2012.

GOETZE, M. **Especiação e diversidade genética no subgênero *Ortgiesia* (*Aechmea*, Bromeliaceae)**. 2014. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

GOETZE, M., *et al.* Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. **Biochemica Systematics and Ecology** 58: 204-210. 2015.

GOETZE, M., PALMA-SILVA, C., ZANELLA, C.M., BERED, F. East-to-west genetic structure in populations of *Aechmea calyculata* (Bromeliaceae) from the southern Atlantic rainforest of Brazil. **Bot J Linn Soc** 181: 477–490. 2016.

GOETZE, M., ZANELLA, C.M., PALMA-SILVA, C., BÜTTOW, M.V., BERED, F. Incomplete lineage sorting and hybridization in the evolutionary history of closely related, endemic yellow flowered *Aechmea* species of subgenus *Ortgiesia* (Bromeliaceae). **Am J Bot** 104(7): 1073- 1087. 2017.

GOETZE, M., CAPRA, F., BÜTTOW, M.V., ZANELLA, C.M., BERED, F. High genetic diversity and demographic stability in *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), a species of sandy coastal plains (restinga habitat) in southern Brazil. **Bot J Linn Soc** 186(3): 374–388. 2018.

GOIS, I. B. *et al.* Variabilidade genética em populações naturais de *Ziziphus joazeiro* Mart., por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 4, p. 621-630, 2014.

GOUDA, E.J., BUTCHER, D.; GOUDA, C.S. (cont.updated) **Encyclopaedia of Bromeliads, Version 4**. Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> University Botanic Gardens, Utrecht. 2018.

GONÇALVES, F. **Padrões de diversidade genética e filogeografia de *Tillandsia aeranthos* (Lois.) LB Smith** (Bromeliaceae). 2018.

GONÇALVES-OLIVEIRA, R.C., *et al.* Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): The role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. **Am J Bot** 104 (6): 1–11. 2017.

GONZÁLES-ASTORGA, J., *et al.* Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). **Annals of Botany** 94: 545–551. 2004.

GUIMARÃES, C. *et al.* Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 24–33, 2009.

GRIME, J.P. Plant strategies and vegetation processes. **John Wiley and Sons**, Chuchester, 222p, 1979.

HARDY, OJ; VEKEMANS, X. Isolamento por distância em uma população contínua: reconciliação entre análise de autocorrelação espacial e modelos de genética populacional. **Heredidade**, v. 83, pág. 145–154, 1999.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. Principles of population genetics. Sunderland: **Sinauer Associates**, 1997, 542p.

HASSEL, K., *et al.* Genetic variation and structure in the expanding moss *Pogonatum dendatum* (Polytrichaceae) in its area of origin and in a recently colonized area. **American Journal of Botany**. v.92, n.10, p.1684-1690, 2005.

HMELJEVSKI, K.V. *et al.* Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics** 12(3): 761-769. 2011.

HMELJEVSKI, K.V.; REIS, M.S.; FORZZA, R.C. Patterns of Gene Flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a Monocarpic Species of Bromeliaceae from Brazil. **Journal of Heredity** 106:93–101. 2015.

HMELJEVSKI, K.V. **Caracterização reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz, uma bromélia endêmica do Vale do Itajaí, SC.** Dissertação de Mestrado na Universidade Federal de Santa Catarina. 60p. 2007.

HMELJEVSKI, K.V. *et al.* Do plant populations on distinct inselbergs talk to each other? A case study of genetic connectivity of a bromeliad species in an Ocbil landscape. **Ecol Evol** 7(13):4704–4716. 2017.

HORNUNG-LEONI, C. T. *et al.* Genetic variation in the emblematic *Puya raimondii* (Bromeliaceae) from Huascarán National Park, Peru. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 67-74, 2013.

IDREES, M.; IRSHAD, M. Molecular Markers in Plants for Analysis of Genetic Diversity: A Review. **European Academic Research**, v. 2, n. 1, p. 1513-1540, 2014.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M. M. R. ISSR variations em eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**. n.117, p.186-190, 2008.

IUCN 2013. **IUCN Standards and Petitions Subcommittee. 2013. Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 10.** Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee.

IZQUIERDO, L.Y., PIÑERO, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). **Australian Journal of Botany** 48: 645-650. 2000.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une porion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles**, v.37, p. 547-579, 1901.

JAGGI, C.; WIRTH, T.; BAUR, B. Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura Mountains: implications for a conservation strategy. **Biological Conservation**, v.94, p.69-77, 2000.

JAMES, E.A.; ASHBURNER, G.R. Intraspecific variation in *Astelia australiana* (Liliaceae) and implications for the conservation of this Australian species. **Biological Conservation**, v.82, p.253-261, 1997.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J.E.G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, v.101, p.147-156, 2001.

JUNIOR, H. V. P. **Estrutura, diversidade e distribuição espacial de comunidades vegetais sobre inselbergs do Espírito Santo**, Brasil. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.

KAMADA, T., *et al.* Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.

LAVOR, P. *et al.* Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range. **American Journal of Botany** 101: 1167-1175. 2014.

LAURANCE, W.F. *et al.* Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-years investigation. **Conservation Biology**, 6(3): 605-618. 2002.

LEME, E.M.C., *et al.* Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. **Rodriguésia** 61:21-67. 2010.

LEXER, C., *et al.* Gene flow and diversification in a species complex of *Alcantarea* inselberg bromeliads. **Bot J Linn Soc** 181(3): 505-520. 2016.

LIMA, T. T. **Bromeliaceae da Serra da Mantiqueira: distribuição geográfica e conservação**. São Paulo, 357 p.il. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 2008.

LINDEN, R. Técnicas de Agrupamento. **Revista de Sistemas de Informação da FSMA**. n. 4, p. 18-36. 2009.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 15, 65-95. 1984.

LOH, R. *et al.* Clonality strongly affects the spatial genetic structure of the nurse species *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, n. 2, p. 329-341, 2015.

LUDTKE, R., *et al.* Characterizing *Polygala* L. (Polygalaceae) species in southern Brazil using ISSR. **Plant Molecular Biology Report**. n.28, p. 317-323, 2010.

MACHADO, T. M; FORZZA, R. C.; STEHMANN, J. R. Bromeliaceae from caparaó national park, minas gerais/espírito Santo States, Brazil, with notes on distribution and conservation. **Oecologia Australis**, v. 20, n. 2, 2016.

MAMURIS, Z.; SFOUGARIS, A.I.; STAMATIS, C. Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. **Biological Conservation**, v.101, p.187-196, 2001.

MANICA-CATANI, M. F., *et al.* Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (verbanaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**. v.2, n.69, p.375-380, 2009.

MARTINELLI, G., *et al.* Bromeliaceae da Mata Atlântica: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia** 59: 209-258. 2008.

MARTINELLI, G; MORAES, M.A. **Livro vermelho da Flora do Brasil**. Centro Nacional de Conservação da Flora: 1100 p. 2013.

MARTINS, P.S. Preservação e genética evolutiva in: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, Jaboticabal, **Anais**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1988. p.62-66. 1988.

MATALLANA, G. *et al.* Breeding systems of Bromeliaceae species: Evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution**, v. 289, p.57-65, out. 2010.

MATOCQ, M. D.; VILLABLANCA, F. X. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern?. **Biological Conservation**, v. 98, n. 1, p. 61-68, 2000.

MEIRELES, J.E.; MANOS, P.S. Pervasive migration across rainforest and sandy coastal plain *Aechmea nudicaulis* (Bromeliaceae) populations despite contrasting environmental conditions. **Mol Ecol** 27:1261–1272. 2018.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, v. 50, n. 2, p. 159-179, 1985.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2017. **Conservação in situ, ex situ e on farm**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e>

promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conservação-in-situ-ex-situ-e-on-farm>. Acesso dia 02 de nov. de 2020.

MIRANDA, F. D. de *et al.* Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 3, p. 319-323, 2012.

MONTEIRO, R.F. Taxonomy of *Fernseea*: a Brazilian endemic and endangered genus of Bromeliaceae. *Brittonia*. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12228-020-09640-x>>. 2020.

MOJEMA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.

MORAES R.M., BONIFÁCIO-ANACLETO F., ALZATE-MARIN, A.L. Fragmentation effects and genetic diversity of the key semideciduous forest species *Metrodorea nigra* in Southwestern Brazil. **Genetics and Molecular Research** 14: 3509-3524. 2015.

MÖLLER, M; PINHEIRO, J.B. Comparações e novas abordagens no desenvolvimento de marcadores microssátelites. In: **Seminários Em Genética Melhoramento De Plantas**, Piracicaba: Usp, 2014. p. 1-2, 2014.

MURAWSKI, D.A., HAMRICK, J.L. Local genetic clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalena*. **American Journal of Botany** 77(9): 1201-1208. 1990.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NERI, J., WENDT, T., PALMA-SILVA, C. Natural hybridization and genetic and morphological variation between two epiphytic bromeliads. **AoB Plants** 10(1): plx061. 2017.

NOROOZISHARAF, A., *et al.* Genetic diversity of endangered primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) accessions from Iran revealed by ISSR and IRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 190, p. 173-178, 2015.

NORRIS, K. Biodiversity in the context of ecosystem services: the applied need for systems approaches. *Philosophical transactions of the royal society*. **Biological Sciences** 367: 191-199. 2012.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

OLIVEIRA, R. C. G. **Estudos moleculares populacionais com o complexo específico *Encholirium spectabile* Mart. ex Schult. f. em 'inselbergs' do Nordeste Brasileiro**. 2012. Dissertação de Mestrado.

PALMA-SILVA, C. *et al.* Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in a Neotropical forest species, *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). **Heredity** 103: 502-512. 2009.

PALMA-SILVA, C. *et al.* Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology** 20: 3185-3201. 2011.

PAMPONET, V.C.C., *et al.* Reduced genetic diversity in endemic Brazilian *Lymania* spp (Bromeliaceae) populations and implications for conservation. **Genet Mol Res** 12 (4): 4352-4362. 2013.

PARKER, P.G., *et al.* What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Mol Ecol** 79:361-382.1998.

PENCE, C.H. Is genetic drift a force? **Synthese**, v. 194, p.1967-1988, 2016.

PHARMAWATI, M.; YAN, G.; FINNEGAN, P. M. Molecular variation and fingerprint of *Leucadendron cultivars* (Proteaceae) by ISSR markers. **Annals of Botany**. n.95, p.1163-1170, 2005.

PITHER, R.; SHORE, J.S.; KELLMAN, M. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. *Heredity*, v.91, p.307-313, 2003.

POCZAI, P.; *et al.* Genetic variability of thermal *Nymphaea* (Nymphaeaceae) populations based on ISSR markers: implications on relationships, hybridization, and conservation. **Plant Molecular Biology Reports**. n.29, p.906-918, 2011.

POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. Rostock: **Revista Brasil. Bot**, v. 30, n. 4, p.579-586, 2007.

PRIMACK, RB; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: ISBN, 328. p., 2001.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. Documentation for structure software: Version 2.74 **University of Chicago**, Chicago, IL, 2002

REDDY, M.P; SARLA, N.; REDDY, E.A. *Inter simple sequence repeat* (ISSR) polymorphism and its application plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

REIF, J.C., *et al.* Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical and temperate germplasm by SSR markers. **Crop Science**, 44:326-334. 2004.

REIS, A.M.A. **Disitribuição da Variabilidade Genética em Aroeira** (*Myracrodruon urundewa*, Anacardiaceae) **por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de cpDNA**. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São de Paulo, Piracicaba, 1999.

RIBEIRO, I. F. **Diversidade Genética De *Aechmea Blanchetiana* (Baker) Lb Smith (Bromeliaceae) Em Áreas De Restinga No Norte Do Estado Do Espírito Santo**, Brasil. Dissertação De Mestrado Em Biodiversidade Tropical. Universidade Federal Do Espírito Santo São Mateus. 2017.

RIBEIRO, J. E. S.; *et al.* **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia central**. Manaus: INPA. 816 p. il. 1999.

RIBEIRO, P.C. *et al* Genetic diversity of *Vriesea cacuminis* (Bromeliaceae): an endangered and endemic Brazilian species. **Genet Mol Res** 12(2):1934-1943. 2013.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Dissertação de Mestrado, 81p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.

ROGALSKI, J.M. *et al.* Mating system and genetic structure across all known populations of *Dyckia brevifolia*: a clonal, endemic, and endangered rheophyte Bromeliad. **J. Hered** 108:299–307. 2017.

ROHLF, F. J.; FISHER, D.R. Tests for hierarchical structure in random data sets. **Systematic Biology**, v. 17, n. 4, p. 407-412, 1968.

ROLDAN-RUIZ, I. *et al.* AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, n.6, p.125–134, 2000.

RUAS, R. de B. **Diversidade e estrutura genética em *Dyckia excelsa*: uma espécie ameaçada dos afloramentos rochosos ferruginosos (cangas) no Bioma Pantanal**. 2018.

SALEHI, M. M.; SEBER, G. A. F. Two-stage adaptive cluster sampling. **Biometrics**, v. 53, p. 959-970, 1997.

SALES, E., NEBAUER, S.G., MUS, M., SEGURA, J. Population genetic study in the balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. **Am J Bot** 88:1750-1759. 2001.

SARTHOU, C. *et al.* Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. **Am J Bot** 88:861-868, 2001.

SEBBENN, A.M. *et al.* Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredidade**, v. 106, p. 134-145, 2011.

SEBER, G. A. F.; THOMPSON, S. K. Environmental adaptive sampling. In: PATIL G. P.; RAO, C. R. (Eds.). **Environmental statistics** - handbook of statistics. v. 12. Elsevier Science, 1994. p. 201-220.

SEXTON, J. P. *et al.* Genetic isolation by environment or distance: Which pattern of gene flow is most common? **Evolution**, v. 68, n. 1, p. 1–15, 2014.

SGORBATI, S., *et al.* A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. **Plant Biol** 6: 1-9. 2004.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. A. **Mathematical model of communication.** Urbana: University of Illinois Press, 1949.

SHARMA, I.K.; CLEMENTS, M.A.; JONES, D.L. **Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae) *Biochemical Systematics and Ecology*, v.28, p.651-663, 2000.**

SHARMA, I.K. Understanding clonal diversity patterns through allozyme polymorphism in an endangered and geographically restricted Australian shrub, *Zieria baeuerlenii*, and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.681-695, 2001.

SHEU, Y. *et al.* **Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest.** Volume 16, Número 2, 2017.

SICARD, D., *et al.* Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *landraces* in central Italy. **Plant Breeding**, v. 124, p. 464-472. 2005.

SILVA, C. P. **Genética, Filogeografia e Fertilidade de populações de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae).** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

SMITH, L.B. Geographical evidence on the lines of evolution in Bromeliaceae. **Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie** 66:446-468. 1934.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica** Monograph, Hafner Press, New York. V. 14 part 1, pp. 1-658. 1974.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification.** San Francisco, WH Freeman. 573p. 1973.

SOARES, L. E., *et al.* Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. **Genetics and molecular biology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p. 33-40, 1962.

SOLTIS DE, G.A.J., RIESEBERG, L., GARDNER, S. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionatha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany** 74(4):531-537. 1987.

SOUSA, D. B.; *et al.* Paricá: *Schizolobium amazonicum*. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, Benevides - PA, n. 13, p. 2, 2005.

SOUZA-SOBREIRA, F. B. *et al.* Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammea* (L.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. **Genet. Mol. Res**, v. 14, p. 15892-15901, 2015.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 199–203, 2000.

TANYA, P., *et al.* Genetic diversity among jatropha and jatropha-related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Report**. n.29, p.252-264, 2011.

TANSLEY, S.A.; BROWN, C.R. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. **Biological Conservation**, v.95, p.39-48, 2000.

TATIKONDA, L. *et al.* AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L. biofuel plant. **Plant Science**. v. 176, p. 505-513, 2009.

TERBORGH, J; VAN SCHAİK, C. Porque o mundo necessita de parques. In Jonh Terborgh *et al.* (org). **Tornando os parques eficientes. Estratégias para a conservação da natureza nos trópicos**. Fundação O Boticário, Curitiba, p.25-36, 2002.

THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>.

THOMPSON, S. K. Adaptive cluster sampling. **Journal of the American Statistical Association**, v. 85, n. 412, p. 1050-1059, 1990.

THOMPSON, S. K.; SEBER, G. A. F. **Adaptive Sampling**. John Wiley & Sons, New York. 265 p. 1996.

VAZ PATTO, M. C. *et al.* Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 137, n. 1, p. 63–72, 2004.

VERSIEUX, L.M.T., *et al.* Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. **Mol. Phylogenet. Evol.** 64: 177-189. (2012). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.015>>.

WANDERLEY, M.G.L.; MARTINS, S.E. (coord.). Bromeliaceae. In: WANDERLEY, M.G.L., SHEPHERD, G.J., MELHEM, T.S.A. & GIULIETTI, A.M. (Coords.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 5, pp. 39-161. 2007.

WANG, I. J.; BRADBURD, G. S. Isolation by environment. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 5649–5662, 2014.

WAWRA, H. 1880. Die Bromeliaceen – Ausbeute von der reise der Prinzen August Ferdinand von Sachsen-Coburg nach Brasilien 1879. **Oesterreichische Botanische Zeitschrift** 30.

WIDEN, B.; CRONBERG, N.; WIDEN, M.; Genotypic diversity, molecular markers and spatial-distribution of genets in clonal plants, a literature survey. **Folia Geobotanica et Phytotaxonomica**, v. 29, p. 245–263, 1994.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E., *et al* (Eds.). **Molecular systematic of plants: DNA sequencing**. New York: Kluwer, 1-42 p. 1998.

WRIGHT, S. **Evolution in Mendelian populations**. Genetics, v.16, p.97-159, 1931.

WÖRHMANN, T., WEISING, K. 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. 2011.

YAMAMOTO, T., *et al.* *Simple sequence repeat* for genetic analysis in pear. **Euphytica** 124:129-137. 2002.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v. 129, p.156-157, 1997.

YIN, Y. *et al.* Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD, ISSR, and SRAP fingerprinting. **Current microbiology**, v. 68, n. 3, p. 397-403, 2014.

ZANELLA, C.M., *et.al.* Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany** 98: 1-9. 2011.

ZANELLA, C.M., *et al.* Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. **Gen Mol Biol** 35:1020–1026. 2012a.

ZANELLA, C.M., *et al.* Microsatellites in the Endangered Species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and Cross-Amplification in Other Bromeliads. **Int J Mol Sci** 13:15859-15866. 2012b.

ZANELLA, C.M. **Padrões históricos e processo de hibridação entre duas espécies simpátricas de bromélias da Mata Atlântica: implicações evolutivas e conservacionistas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 127 pp. 2013.

ZHANG, F. *et al.* Genetic relatedness among *Aechmea* species and hybrids inferred from AFLP markers and pedigree data. **Scientia horticultrae**, v. 139, p. 39-45, 2012.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. Genome fingerprinting by *simple sequence repeat* (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176–83. 1994.

ZUCCHI, M.I., **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Piracicaba. 130p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2002.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Compilado dos estudos de diversidade e estrutura genética realizados para populações naturais na família Bromeliaceae destacando os marcadores moleculares utilizados.

<b>Espécie</b>	<b>Marcador molecular</b>	<b>H<sub>o</sub>/mean</b>	<b>H<sub>e</sub>/mean</b>	<b>F<sub>is</sub>/mean</b>	<b>F<sub>st</sub>/ mean</b>	<b>Autor</b>
<i>Aechmea calyculata</i>	SSR	0.427	0.576	0.105	-	Goetze <i>et al.</i> , 2016
<i>Aechmea kertesziae</i>	SSR	0.618	0.710	0.155	-	Goetze <i>et al.</i> , 2018
<i>Aechmea magdalena</i>	Aloenzimas	0.099	0.084	-	0.356	Murawski e Hamrich, 1990
<i>Aechmea nudicaulis</i>	SSR	0.576	0.519	-0.110	-	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Aechmea nudicaulis</i>	SSR	0.683	0.850	0.057	-	Loh <i>et al.</i> , 2015
<i>Aechmea ramosa</i>	SSR	0.407	0.481	0.143	-	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Aechmea tuitensis</i>	Aloenzimas	0.061	0.120	0.631	0.196	Izquierdo e Piñero, 2000
<i>Aechmea winkleri</i>	SSR	0.563	0.587	0.048	-	Goetze <i>et al.</i> , 2015
<i>Alcantarea brasiliiana</i>	SSR	0.240	0.340	-	-	Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea geniculata</i>	SSR	0.349	0.430			Lexer <i>et al.</i> 2016
<i>Alcantarea glaziouana</i>	SSR	0.301	0.473	0.343	0.217	Barbará <i>et al.</i> , 2009
<i>Alcantarea imperialis</i>	SSR	0.403	0.480	-	-	Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea martinellii</i>	SSR	0.356	0.271	-	-	Lexer <i>et al.</i> , 2016
<i>Alcantarea nevaesii</i>	SSR	0.206	0.217	-	-	Lexer <i>et al.</i> , 2016

<i>Alcantarea regina</i>	SSR	0.557	0.600	-0.236	0.195	Barbará <i>et al.</i> , 2009
<i>Billbergia euphemia</i>	SSR	0.390	0.483	0.419	0.177	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Billbergia horrida</i>	SSR	0.430	0.435	-0.041	-	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Bromelia antiacantha</i>	SSR	0.327	0.559	0.412	0.224	Zanella <i>et al.</i> , 2011
<i>Dyckia brevifolia</i>	Aloenzimas	0.070	0.067	-	-	Rogalski <i>et al.</i> , 2017
<i>Dyckia ibiramensis</i>	Aloenzimas	0.156	0.418	1.181	0.674	Hmeljevski <i>et al.</i> , 2011
<i>Encholirium biflorum</i>	RAPD	-	-	-	0.160	Cavallari <i>et al.</i> , 2006
<i>Encholirium pedicellatum</i>	RAPD	-	-	-	0.084	Cavallari <i>et al.</i> , 2006
<i>Encholirium spectabile</i>	SSR	0.497	0.657	0.257	-	Gonçalves-Oliveira <i>et al.</i> , 2017
<i>Encholirium subsecundum</i>	RAPD	-	-	-	0.012 <sup>c</sup>	Cavallari <i>et al.</i> , 2006
<i>Lymania azurea</i>	RAPD	-	-	-	-	Pamponet <i>et al.</i> , 2013
<i>Lymania smithii</i>	RAPD	-	-	-	-	Pamponet <i>et al.</i> , 2013
<i>Pitcairnia albiflos</i>	SSR	0.383	0.429	0.109	0.336	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2011
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	SSR	0.293	0.325	0.125	0.156	Boisselier-Dubayle <i>et al.</i> , 2010
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	Aloenzimas	0.185	0.183	-	-	Sarthou <i>et al.</i> , 2010
<i>Pitcairnia flammea</i>	ISSR	-	-	-	-	Souza-Sobreira <i>et al.</i> , 2015
<i>Pitcairnia flammea</i>	SSR	0.759	0.505	0.424	-0.112	Sheu <i>et al.</i> , 2017
<i>Pitcairnia staminea</i>	SSR	0.347	0.452	0.240	0.336	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2011
<i>Puya raimondii</i>	AFLP	-	-	-	0.961	Sgorbati <i>et al.</i> , 2004

<i>Tillandsia aeranthos</i>	SSR	0.756	0.857	0.116	0.0128	Gonçalves, 2018
<i>Tillandsia achyrostachys</i>	Aloenzimas	0.127	0.210	0.433	0.391	González-Astorga <i>et al.</i> 2004
<i>Tillandsia ionantha</i>	Aloenzimas	0.065	0.070	0.056	0.043	Soltis <i>et al.</i> , 1987
<i>Tillandsia recurvata</i>	Aloenzimas	-	0.01	1.000	0.906	Soltis <i>et al.</i> , 1987
<i>Tillandsia recurvata</i>	SSR	0,071	0,634	0,795	0,0308	Gonçalves, 2018
<i>Vriesea cacuminis</i>	ISSR	-	-	-	-	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
<i>Vriesea friburgensis</i>	Aloenzimas	-/0.234	-/0.226	-0.035	-	Alves <i>et al.</i> , 2004
<i>Vriesea minarum</i>	SSR	0.424	0.628	-	0.088**	Lavor <i>et al.</i> , 2014
<i>Vriesea reitzii</i>	SSR	0.437	0.534	-	0.168	Soares <i>et al.</i> , 2018
<i>Vriesea scalaris</i>	SSR	0.170	0.347	-	0.521	Neri <i>et al.</i> , 2017
<i>Vriesea simplex</i>	SSR	0.550	0.604	-	0.168	Neri <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Adaptado pela autora do trabalho de Ruas (2018).

APÊNDICE B - *Primers* ISSR produzidos pela University of British Columbia e suas respectivas sequências utilizados para amplificação, com temperatura de anelamento ( $T_m$ ) em amostras de DNA de 2 indivíduos da espécie *F. itatiaiae* e *A. vanhoutteana*.

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
UBC 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
UBC 855	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
UBC 861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
UBC 868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA

\* A = Adenina; T = Timina; C = Citosina; G = Guanina; H = (A, T ou C); R = (A ou G); V = (A, C ou G) e Y = (C ou T).