

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Michelle Bandeira de Carvalho

Diversidade genética da *Vriesea botafogensis* Mez (Bromeliaceae):
uma espécie endêmica de *inselbergs* ameaçada de extinção

Rio de Janeiro

2015

Michelle Bandeira de Carvalho

Diversidade genética da *Vriesea botafogensis* Mez (Bromeliaceae):
uma espécie endêmica de *inselbergs* ameaçada de extinção

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Fabiano Salgueiro

Rio de Janeiro

2015

Carvalho, Michelle Bandeira de.
C331 Diversidade Genética da *Vriesea botafogensis* Mez (Bromeliaceae):
uma espécie endêmica de *inselbergs* ameaçada de extinção / Michelle
Bandeira de Carvalho, 2015.
94 f. ; 30 cm

Orientador: Fabiano Salgueiro.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

1. *Vriesea botafogensis*. 2. *Vriesea saundersii* 3. *Inselbergs* 4 Bromeliaceae –
Mata Atlântica – Rio de Janeiro (RJ). 5. Microsatélites (Genética). 6. Plantas em
extinção. I. Salgueiro, Fabiano. II. Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Curso de Mestrado em
Ciências Biológicas. III - Título

CDD – 584.22098153



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
Instituto de Biociências (IBIO)
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PGBIO)
Mestrado em Biodiversidade Neotropical

“Diversidade genética de *Vriesea botafogensis* mez (bromeliaceae): uma espécie endêmica de *inselbergs* ameaçada de extinção”

por

Michelle Bandeira de Carvalho

Dissertação de Mestrado

Banca Examinadora


Prof. Dr. Fabiano Salgueiro (Orientador)


Prof. Dr. Andrea Ferreira da Costa


Prof. Dr. Catarina da Fonseca Lira de Medeiros

Conceito: B

Março de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao tempo, por ter me permitido viver os momentos mais lindos da minha vida ao lado do homem mais especial que por ela passou! Esse tempo, que por vezes parecia apressado, foi ao mesmo tão generoso, ao nos conceder mais 10 anos, de muito aprendizado! Tempo esse que nunca, nunca nos foi perdido!! Tempo que nos permitiu dividir planos, almejar sonhos, somar conquistas!! Tempo que nos fez acreditar que ainda era possível conseguir mais tempo! Tempo que prossegue, mesmo após a interrupção de nossa parceria! Parceria essa que também continua, só que em outro tempo, o tempo de quem acredita no pra sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à força motriz: Deus, primeiramente, pela benção da vida! Agradeço pelos inúmeros desafios, essências ao meu fortalecimento; mas também por ter me dado alegrias, para desfrutar; oportunidades, para aproveitar; e pessoas amigas, para somar!

Agradeço aos meus pais, Almir e Magna, por sempre vibrarem à cada conquista! Por apoiarem as minhas decisões e por não se curvarem frente às dificuldades!

Agradeço à minha avó, Dalva, por ter sido a referência da minha vida, por ter sempre me incentivado e acreditado no meu avanço. Mas agradeço acima de tudo, por ter dividido comigo, um pouco de sua sabedoria!

Agradeço ao meu padrinho, Miridian Bandeira, por estar sempre disposto a ajudar, e principalmente, por me passar um carinho de pai, que me faz sentir mais preenchida!

Agradeço à UNIRIO e ao PBGBIO, pela oportunidade concedida, pelo suporte ao longo do mestrado e por nos disponibilizar excelentes professores.

Agradeço ao CNPq, PROAP-CAPES, UNIRIO e IFRJ pelo apoio ao projeto e especialmente à CAPES pela bolsa de estudo.

Agradeço ao meu orientador, Fabiano Salgueiro, por ter compreendido inúmeras vezes as minhas dificuldades, por ter respeitado as minhas decisões e por ter contribuído para o meu aprendizado!

Agradeço às Prof. (as) Andrea Costa, Camila Patreze, Catarina Lira e Michelle Sampaio por aceitarem prontamente ao convite de comporem a minha banca de mestrado.

Agradeço a colaboração de Ana Angélica, Andrea Costa, Claudio França, Leandro Cardoso, Ricardo Moura e Rodrigo Tarjano nas atividades de coleta.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Vegetal Molecular, pessoas nas quais lembrarei, como companheiros de bancada e risadas: Bruno Micelli, Bruno Paixão, Carolina Marques, Erick Lopes, Fernanda de Andrea, Gabriella Marinho, Guilherme Mello, Igor Kessous, Karoline Telles, Maira Vieira, Mateus Castro, Miguel Schonmann, Samara Ribeiro, Suema Branco e Vinícius Chiapetta.

Agradeço especialmente ao Mateus Castro por ter sido sempre tão prestativo ao longo do meu mestrado. Pelas inúmeras vezes que deixou esfriando a centrífuga enquanto eu me dirigia à UNIRIO, às várias vezes que interrompeu corrida do gel e revelou as minhas fotos, e também por ter dado continuidade às extrações de DNA, no período em que eu me acidentei.

Agradeço especialmente à Fernanda de Andrea e ao Guilherme Mello, que além do auxílio técnico dentro do laboratório, sempre estiveram dispostos a me ouvir e me ajudar, tornando-se grandes amigos e conselheiros. Uma amizade que, sem dúvida, vai além dos muros da UNIRIO!

Agradeço à Ana Angeletti, Tatiana Silveira e Tatiane Dias, minhas companheiras de turma, que não só deram um toque especial as aulas, mas foram além disso! Agradeço pelos momentos de risada, pelos almoços divertidíssimos e acima de tudo, por terem sido o meu suporte no dia em que fiquei sem chão. O dia que marca a nossa amizade, como verdadeira e eterna!

Agradeço à minha família de amigos, presentes não só nos momentos de lazer mas também nos momentos de dificuldade! Amigos que vibram, torcem, roem as unhas, choram e gritam de felicidade à cada degrau que subo! Amigos na qual não divido o laço fraterno, mas divido o amor incondicional da amizade!

Agradeço especialmente às amigas Carolina Lino, pelo suporte nas traduções; à Fernanda Carvalho e Rodrigo Gomes, pelo suporte gráfico, à Marissol Miranda e Nathasha Carolina, pelas impressões, ao Leonardo Soares pelo suporte na normalização técnica, e

às vizinhas-amigas Erika Viana e Maria Viana, por me cederem espaço em sua casa, nas várias vezes que precisei usar a internet.

Quanto maior o conhecimento menor o ego, quanto maior o ego menor o conhecimento.

(Albert Einstein)

RESUMO

A Mata Atlântica é considerada um dos 34 hotspots, visto a elevada biodiversidade presente nesta área. Neste bioma distribuem-se as espécies *Vriesea botafogensis* Mez e *Vriesea saundersii* Carrière, cuja ocorrência se dá em *inselbergs*, ao leste e oeste da Baía de Guanabara. *Vriesea botafogensis* é considerada endêmica e criticamente em perigo, bem como é confundida com *V. saundersii* por conta dos aspectos morfológicos semelhantes. Dessa forma, obter conhecimento à respeito da diversidade genética de espécies ameaçadas torna-se cada vez mais importante, principalmente no cenário de intensa antropização nas quais as espécies deste estudo estão sujeitas. O presente trabalho tem como objetivo estimar a variabilidade genética das três populações remanescentes conhecidas de *V. botafogensis* e comparar com uma população de *V. saundersii*. Estas populações foram analisadas utilizando-se oito marcadores microssatélites nucleares (nSSR) e quatro locos do DNA do cloroplasto (cpDNA). A partir das análises descritivas observou-se os maiores índices de R_s , A_p , H_E , H_O nas populações de Itacoatiara e Pedra Bonita. As análises de estruturação genética resultaram em índices elevados de F_{ST} ($F_{STc} = 0.81$ e $F_{STn} = 0.48$). Os estudos com base nos locos de cpDNA demonstraram menor variabilidade genética na Chacrinha e foi constatado a existência de estrutura filogeográfica. Com base em estudos que fizeram uso de microssatélites em Bromeliaceae observou-se valores moderados de heteroziguidade, condizentes com as espécies deste estudo. As populações da Chacrinha e do Pão de Açúcar apresentaram valores positivos de coeficiente de endocruzamento (f), em contraste com Itacoatiara e Pedra Bonita, o que sugere um processo de endogamia, condizente com os desvios no $EqHW$ para excesso de homozigotos. Dessa forma é possível concluir: (i) Itacoatiara e Pedra Bonita foram as que apresentaram maior variabilidade genética; (ii) Pão de Açúcar e Chacrinha apresentam maior similaridade genética, sugerindo um maior fluxo gênico entre elas via pólen e sementes, enquanto que as populações Itacoatiara e Pedra Bonita são geneticamente mais distintas; (iii) A baía de Guanabara pode ser considerada um fator de isolamento entre as populações; (iv) As populações da Chacrinha e Pão de Açúcar são geneticamente mais relacionadas com a população da Pedra Bonita do que com a de Itacoatiara, embora tratem-se de espécies diferentes. Entretanto, este resultado pode estar relacionado com problemas técnicos encontrados na genotipagem dos indivíduos da população de Itacoatiara; (v) As espécies *V. botafogensis* e *V. saundersii* apresentam estrutura filogeográfica, contendo haplótipos singulares e com baixa diferenciação. No que tange a conservação de *V. botafogensis*, recomenda-se que a população de Itacoatiara seja tratada como uma unidade evolutiva independente, enquanto que as populações da Chacrinha e Pão de Açúcar podem ser tratadas em conjunto.

Palavras-chave: *V. saundersii*. cpDNA. nSSR. *Inselbergs*. Genética da conservação.

ABSTRACT

The Atlantic Forest is considered one of the 34 hotspots, due to a high biodiversity existing in this area. In this biome is distributed species *Vriesea botafogensis* Mez and *Vriesea saundersii* Carrière, whose occurrence is given in inselbergs, north and south of the Guanabara Bay. Both species are endemic and classified as critically endangered as well as confused because of similar morphology. In this way, get the knowledge about the genetic diversity of endangered species becomes increasingly important, especially in the intense anthropization scenario to which species of this study are subject. This study has as objective: To estimate the genetic variability of the three populations of *Vriesea botafogensis* and compare with a population of *V. Saundesii*. These population were analyzed using eight nuclear microsatellite markers (nSSR) and four loci chloroplast DNA (cpDNA). From the descriptive analysis observed that Itacoatiara and Pedra Bonita populations had the highest rates of R_S , A_P , H_E , H_O . The genetic structure analysis resulted in high rates of F_{ST} ($F_{STc} = 0.81$ and $F_{STn} = 0.48$). Studies based on loci of cpDNA demonstrated lower genetic variability in Chacrinha and It was observed phylogeographic structure. Based on studies that made use of microsatellites in Bromeliaceae, it was observed moderate values of heterozygosity, consistent with the species of this study. The Chacrinha and Pão de Açúcar populations showed positive values of inbreeding coefficient (f) in contrast to Itacoatiara and Pedra Bonita, suggesting an inbreeding process, in line with the diversions in E_{qHW} to excess of homozygotes. Therefore, it can be conclude: (i) Itacoatiara and Pedra Bonita were the ones that had the highest genetic variability; (ii) The Pão de Açúcar and Chacrinha have greater genetic similarity suggesting constant gene flow via pollen and seeds, while Itacoatiara and Pedra Bonita are more distinct genetically; (iii) The Guanabara Bay can be considered an isolation factor between populations; (iv) Pedra Bonita is closer genetically populations Chacrinha and Pão de Açúcar than Itacoatiara, although dealing with different species. However, this result may be related to technical problems encounter in the genotyping process of Itacoatiara population; (v) The species *V. botafogensis* and *V. saundersii* present phylogeographic structure containing single haplotype with low differentiation; - With respect to conservation of *V. botafogensis*, It's recommended that Itacoatiara population is treated as an independent evolutionary unit, while Chacrinha and Pão de Açúcar can be treated together.

Keywords: *V. saundersii*. cpDNA. nSSR. Inselbergs. Conservation genetic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa do bioma Mata Atlântica sinalizando em verde as áreas de remanescente florestal. Dados obtidos no período de 2012 à 2013	19
Figura 2a: Indivíduo representante da espécie de <i>Vriesea botafogensis</i>	26
Figura 2b: Indivíduo representante da espécie de <i>Vriesea saundersii</i>	26
Figura 3: Mapa contendo os locais de coleta que perfazem o litoral da região metropolitana do RJ	34
Figura 4: Locais de ocorrências das populações estudadas	35
Figura 5: Árvore filogenética construída com base nos valores de distância genética	55
Figura 6: Gráfico obtido por meio do Teste de Mantel. Eixo x corresponde a distância geográfica, expressas em m e eixo y corresponde a distância genética, com base nos valores de F_{ST}	57
Figura 7: Valores de ΔK obtidos considerando de $K = 1$ à $K = 8$	58
Figura 8: Proporção de mistura bayesiana dos indivíduos pertencentes às três populações de <i>V. botafogensis</i> e à população de <i>V. saundersii</i> , sob o modelo de $K = 1$ (a) e $K = 2$ (b).....	59

Figura 09: Rede de haplótipo contendo os passos mutacionais que separam um haplótipo do outro, bem como um mapa, contendo as populações em estudo, com seus respectivos haplótipos..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Participação dos co-autores envolvidos no desenvolvimento do trabalho de dissertação.....	33
Tabela 2: Relação das populações junto ao código e ao número amostral utilizado neste estudo, com seus respectivos dados de localização geográfica	36
Tabela 3: Relação dos locos empregados neste estudo, espécies de origem, tamanho (pb) e motivo dos microssatélites	39
Tabela 4: Comparação par a par entre as distâncias geográficas (km) das populações	44
Tabela 5: Valores de frequência alélica por loco das quatro populações analisadas	49
Tabela 6: Índices de diversidade genética das quatro populações amostradas	51
Tabela 7: Valores de heterozigosidade obtidos para as quatro populações estudadas	52
Tabela 8: Distâncias genéticas e geográficas encontradas entre os pares de populações analisadas	54
Tabela 9: Teste de agrupamento das populações utilizando a análise molecular de variância (AMOVA).....	55

Tabela 10: Haplótipos representados pelos sítios variáveis (11 no total), junto às populações as quais pertencem	62
Tabela 11: Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) intrapopulacionais de <i>Vriesea botafogensis</i> e <i>V. saundersii</i>	63
Tabela 12: Valores de F_{ST} par a par entre as populações	66
Tabela 13: Teste de agrupamento das populações utilizando a análise molecular de variância (AMOVA).....	67

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	Mata Atlântica	18
1.2	<i>Inselbergs</i>	21
1.3	Família Bromeliaceae	22
1.4	Espécie estudada: <i>Vriesea botafogensis</i> Mez	25
1.5	Diversidade genética	27
1.6	Ferramentas aplicadas a genética da conservação	29
2.	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Coleta do material	34
3.2	Extração e quantificação do DNA genômico	36
3.3	Análises utilizando marcadores microssatélites nucleares	39
3.3.1	Seleção dos marcadores microssatélites nucleares (nSSR)	39
3.3.2	PCR das amostras	40
3.3.3	Genotipagem dos marcadores microssatélites nucleares	42
3.3.4	Análise dos dados (nSSR)	42
3.3.4.1	Análise descritiva da diversidade genética	42
3.3.4.2	Análise da estruturação genética	43
3.4	Análises utilizando sequências de locos do cpDNA	45
3.4.1	Amplificação e sequenciamento dos locos do cpDNA	45
3.4.2	Edição e alinhamento das sequências do cpDNA	46
3.4.3	Análise dos dados (cpDNA)	46
4.	RESULTADOS	48

4.1	Resultados nSSR	48
4.1.1	Análise descritiva da diversidade genética	48
4.1.2	Análise da estruturação genética	55
4.2	Resultados das análises de sequências (cpDNA)	60
4.2.1	Análise descritiva da diversidade genética	60
4.2.2	Análise da estrutura populacional	64
5.	DISCUSSÃO	68
6.	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mata atlântica

A Mata Atlântica é um bioma de elevada biodiversidade (Câmara *et al.*, 2005), que percorre entre pequenas faixas à grandes extensões da costa brasileira, seguindo do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul. Nesse percurso, abrange total ou parcialmente 3.409 municípios em 16 estados brasileiros (RS, RN, SC, PR, GO, MS, ES, BA, AL, SE, PB, PE, CE, SP, MG e RJ), atingindo uma média de 200 Km de largura, em uma área aproximada de 52.000 Km² (Fundação SOS Mata Atlântica, 2013).

A Mata Atlântica apresenta uma composição florística bastante diversificada e uma série de ecossistemas associados, incluindo a Floresta Ombrófila do litoral (Serra do Mar), Mata das araucárias, Florestas semidecíduas do Planalto, manguezais, restingas, campos sulinos e áreas aluviais. Sob o ponto de vista legal, essa configuração atual, mapeada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, e legitimizada pela lei 11. 428 de 2006 e decreto de número 750 de 1993, assegura proteção à todo Domínio Atlântico, sendo relevante sob o aspecto da conservação (Tonhasca *et al.*, 2005).

Este bioma foi incluído no cenário mundial como um dos 34 hotspots de biodiversidade, por Myers (2000), visando a seleção de regiões prioritárias para conservação, visto o acelerado ritmo de degradação em todo o mundo (Câmara *et al.*, 2005). A Mata Atlântica sofreu uma intensa fragmentação nas últimas décadas, resultando em uma diminuição de sua área à menos de 8% da original. A relevância da Mata Atlântica não se limita somente à ação antrópica, mas também a expressiva riqueza de fauna e flora que abriga, e ao elevado endemismo de suas espécies (Myers *et al.*, 2000).

As espécies vegetais da Mata Atlântica apresentam uma ampla variação na sua distribuição espacial. Esse mosaico de comunidades de plantas pode ser considerado estruturalmente dividido em um núcleo, composto por florestas tropicais; e habitats marginais, como a vegetação periférica, incluindo florestas pantanosas e sazonalmente secas; e a vegetação mais aberta, incluindo restingas, campos de altitudes e *inselbergs* (Scarano *et al.*, 2009).

De uma área original distribuída ao longo de 16 estados brasileiros, restam hoje somente 7,3% desse total (Figura 1). Na Serra do Mar, na extensão que inclui os estados do Rio de Janeiro, parte de Minas Gerais e São Paulo, as proporções de matas remanescentes variam de 2,8% em Minas Gerais à 21,6% no Rio de Janeiro (Fundação SOS Mata Atlântica, 2013).

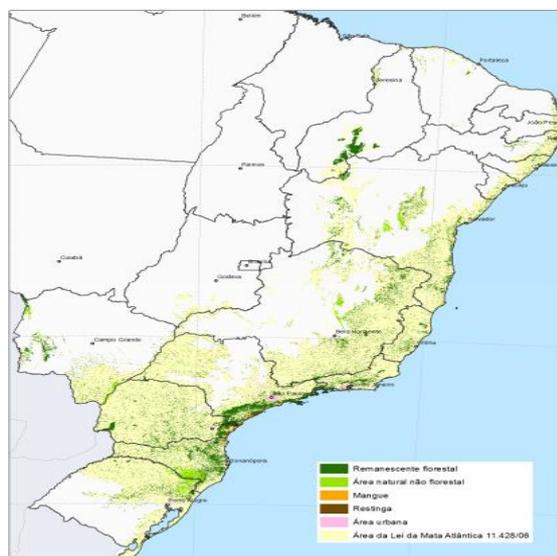


Figura 1: Mapa do bioma Mata Atlântica sinalizando em verde as áreas de remanescente florestal. Dados obtidos no período de 2012 à 2013 (SOS Mata Atlântica, 2012)

Esse bioma sofreu profundas mudanças devido a um crescente processo de urbanização em seus domínios, sobre a qual atualmente concentra cerca de 70% da população brasileira, sendo 80% do PIB brasileiro gerado somente nesta área, abrigando ainda os maiores centros industriais e de silvicultura do país (IESB *et al.*, 2007).

São consideradas como principais ameaças a essa biodiversidade as seguintes atividades: exploração madeireira, caça e comércio ilegal de animais; desenvolvimento urbano e industrial; expansão de áreas agrícolas e implantação de pastagens. Tais atividades contribuem para o atual cenário deste bioma, com somente 1,4 milhões de quilômetros quadrados de mata original (IESB *et al.*, 2007). Embora tenha restado uma parcela muito reduzida e dispersa de Mata Atlântica, este bioma ainda abriga uma proporção considerável de espécies endêmicas. Estima-se que existam cerca de 250 espécies de mamíferos (55 endêmicas), 340 de anfíbios (90 endêmicas), 1.023 de aves (188 endêmicas), e cerca de 20.000 espécies de árvores, metade das quais são endêmicas (Critical Ecosystem Partnership Fund, 2001).

A geomorfologia da região do Domínio Atlântico é explicada pelo movimento convergente entre a placa Amazônica com a Placa de Nazca no período Mioceno, há cerca de 23 milhões de anos, originando pequenas cadeias de montanha ao longo da costa brasileira. O processo de soerguimento ocorreu de forma não homogênea, resultando em formas geológicas abruptas, de diferentes níveis de relevo. As escarpas pertencentes à Serra do Mar, originadas pelo processo de soerguimento, sofreram há cerca de 80 milhões de anos um processo de desgaste, por ação erosiva do vento e da chuva, resultando em picos de formas arredondadas, como o Pão de Açúcar no Rio de Janeiro (Tonhasca *et al.*, 2005)

1.2. *Inselbergs*

O termo *inselberg* foi introduzido pelo geólogo alemão Friedrich Bornhardt em 1900 como ilhas de rochas de origem pré-cambriana, que datam mais de 50 milhões de anos, geralmente monolítica, constituídas de granito ou gnaisse, cuja evolução se faz em razão de uma erosão específica de clima seco, denominada de esfoliação esferoidal (Porembski *et al.*, 2007).

Os *inselbergs* emergem abruptamente acima das planícies que o cercam, e tendem a formar sítios de crescimento cujo microclima seco, com oscilações de temperatura, baixos níveis de precipitação, junto às condições de escassez do solo, sustentam uma vegetação altamente especializada (Porembski *et al.*, 2007). Dessa forma, possuem vários habitats associados, que abrigam um elevado endemismo de fauna e de flora nas regiões em que ocorrem (Bastos *et al.*, 2013).

Essas montanhas pré-cambrianas resguardam grande complexidade biológica, ecológica e geomorfológica (Kluge *et al.*, 2013). São feições de relevo que se distribuem em todas as zonas climáticas e de vegetação do planeta, mas são particularmente abundantes em regiões tropicais e subtropicais, se fazendo presente na Austrália, Índia, China, Malásia, diversos países africanos, Estados Unidos, Bolívia, Venezuela, Guianas, Colômbia e no Brasil (Porembski *et al.*, 2007).

No Brasil, os *inselbergs* ocupam uma faixa que vai do Nordeste até o Rio Grande do Sul. Dentro do domínio Atlântico, no estado do Rio de Janeiro, há *inselbergs* que variam entre 150 a 1.000 m de altura, como por exemplo, o Pão de Açúcar, o Corcovado, o Pico da Tijuca, a Pedra da Gávea e o Costão de Itacoatiara (Verçoza *et al.*, 2013).

Uma fina camada de solo e uma inclinação protuberante compõem as feições de relevo dos afloramentos rochosos que, em geral, dificultam a fixação de raízes e germinação de sementes. Além disso, às condições físicas do ambiente também são desfavoráveis, como exposição direta de ventos, luminosidade, baixa umidade e calor intenso. Dessa forma, as espécies devem dispor de métodos de adaptação para sobrevivência sob tais condições (Verçoza *et al.*, 2013).

1.3. Família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae é uma das maiores famílias botânicas do Neotrópico (Martinelli *et al.*, 2008), apresentando ampla diversidade morfológica e ecológica de vegetais de ocorrência tropical e subtropical (Palma-Silva *et al.*, 2004). Os representantes desta família são encontrados praticamente em todos os ambientes, desde o nível do mar aos elevados altiplanos da Cordilheira dos Andes, variando em locais úmidos, como a Floresta Atlântica, à locais áridos, como a Caatinga (Coffani-Nunes *et al.*, 2002). Além disso, apresentam diferentes hábitos de crescimento (Palma-Silva *et al.*, 2009), podendo ser terrestres, terrestres ocasionais, rupículas, saxícolas ou epífitas, exceto parasitas (Coffani-Nunes *et al.*, 2002).

A família Bromeliaceae obteve sua primeira classificação em 1979, por Smith e Down, sendo dividida em Bromelioideae (~ 650 spp.), Pitcairnioideae (~890 spp.) e Tillandsioideae (~1000 spp.). Apesar das dificuldades na realização de trabalhos filogenéticos desta família, em virtude da homoplasia em sua morfologia, na obtenção de um grupo externo, e da evolução lenta do DNA do cloroplasto, Givnish foi capaz de fornecer uma importante contribuição no que tange à classificação do grupo. Em trabalho

recente (Givnish *et al.*, 2011), a tradicional divisão foi revista através da análise de oito regiões plastidiais, de 46 dos 58 gêneros pertencentes a essa família, sendo possível confirmar a existência de oito subfamílias, sendo elas: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcarnioideae, Puyoideae, Bromelioideae. (Givnish *et al.*, 2011).

Esta família abrange um total de 58 gêneros, que correspondem à cerca de 3.000 espécies (Givnish *et al.*, 2013). Somente nos domínios da Mata Atlântica brasileira há 31 gêneros (803 espécies) e 150 táxons infraespecíficos, dentre os quais 10 gêneros (653 spp.) endêmicos deste bioma. *Vriesea* (166 spp.) é um dos gêneros de maior riqueza (Martinelli *et al.*, 2008) de Bromeliaceae. Além disso, os representantes desta família destacam-se como um dos principais componentes da fitofisionomia brasileira, sendo considerada a maior família dentre as 37 de angiospermas cuja ocorrência se dá exclusivamente no Neotrópico (Givnish *et al.*, 2013).

A família Bromeliaceae contém muitos representantes endêmicos, em virtude do elevado grau de radiação adaptativa reconhecida nessa família (Costa & Gomes-da-Silva, 2013), colocando-a na posição de grande importância no cenário nacional de conservação da biodiversidade (Martinelli *et al.*, 2008). Além disso, esta família é reconhecida pelo seu potencial econômico e/ou ornamental (Costa & Gomes-da-Silva, 2013), sendo amplamente cultivada e utilizada em decorações e projetos paisagísticos, bem como na medicina, alimentação e como fonte de fibras para manufaturas, tornando-a potencial alvo de extrativismo ilegal (Coffani-Nunes *et al.*, 2002).

A família Bromeliaceae, uma das famílias mais representativas de *inselbergs*, desenvolveu adaptações morfológicas e fisiológicas que permitiu sua sobrevivência sob condições de estresse ambiental, o que explica seu sucesso evolutivo na radiação para diferentes pontos do planeta (Benzing *et al.*, 2000; Verçozza *et al.*, 2013). Entre as plantas que vivem sobre *inselbergs* sul-americanos, as espécies de bromélias são especialmente bem representadas (Sarhou *et al.*, 2001). Por serem produto de radiação adaptativa recente, tornam-se sistemas altamente informativos para estudos que visam avaliar os papéis das forças evolutivas na manutenção da coesão das espécies (Palma-Silva *et al.*, 2011).

Como adaptação morfológica, as folhas de bromélias são revestidas por tricomas que permitem absorção de água e nutrientes através da superfície foliar (Costa & Gomes-da-Silva, 2013), além de apresentarem um imbricamento de folhas, sob a forma de roseta, resultando em um tanque natural para acúmulo de água, detritos orgânicos, (Pamponét *et al.*, 2013; Goetze *et al.*, 2014) e microhabitat à diversas formas de vida (Coffani-Nunes *et al.*, 2002). Como adaptação fisiológica, algumas bromélias possuem uma rota alternativa fotossintética, o Metabolismo Ácido das Crassuláceas – CAM (Crayn *et al.*, 2004), com fixação de CO₂ somente à noite, promovendo economia da água absorvida durante o dia (Quezada *et al.*, 2011). Essas adaptações em conjunto, fornecem as bromélias uma excepcional tolerância à ambientes com restrição hídrica, bem como um forte potencial para desenvolvimento em substratos pobres (Benzing *et al.*, 2000; Crayn *et al.*, 2004).

No tocante ao status de conservação, as populações naturais de bromélias presentes na Mata Atlântica vivem em um cenário de considerável ameaça à sua biodiversidade (Martinelli *et al.*, 2008). O Brasil tem uma flora rica em espécies pertencentes à essa família, muitas das quais são de grande interesse para conservação e encontradas em remanescente da Mata Atlântica (Paggi *et al.*, 2010). Esse domínio, que por um lado é um

dos maiores centros de biodiversidade do mundo, por outro é considerado um dos biomas com maiores índices de destruição no planeta (Martinelli *et al.*, 2008).

Sendo assim, a fragmentação do habitat, a urbanização e o intenso extrativismo ilegal associados a essa região, constituem-se nos principais fatores para o declínio dessas populações, registrado pelo número crescente de espécies desta família presente na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN Red List) (Coffani-Nunes *et al.*, 2002).

1.4. Espécie estudada: *Vriesea botafogensis* Mez.

A *Vriesea botafoguensis* Mez (1894) é uma espécie endêmica do estado do Rio de Janeiro, com distribuição extremamente restrita, com área de ocupação de somente 12 km² (Martinelli & Moraes, 2013), sendo considerada uma espécie criticamente em perigo, segundo o Livro vermelho da Flora do Brasil (Martinelli & Moraes, 2013).

Essa condição de ameaça deve-se ao fato de suas populações estarem localizadas em áreas isoladas, associadas à afloramentos rochosos, em uma matriz severamente fragmentada no bioma Mata Atlântica. Além disso, tais afloramentos são cercados por áreas urbanizadas, com práticas de atividades recreativas, como escalada em rocha, que comprometem a qualidade do habitat (Martinelli & Moraes, 2013).

No que tange ao tratamento nomenclatural, em 1955 *V. botafogensis* (Figura 2a) e *V. saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez (Figura 2b) foram reduzidas a uma única espécie. Essa sinonimização, proposta por L. B. Smith, baseou-se em características em comum, como área de ocorrência, caracteres morfológicos e tipo de hábito, além do fato

de ambas serem endêmicas de *inselbergs* da região metropolitana do Rio de Janeiro (Leme & Costa, 1994).



Figura 2a – Indivíduo representante da espécie de *V. botafogensis* (Foto: Salgueiro, 2009); Figura 2b – Indivíduo representante da espécie de *V. saundersii* (Foto: Shamale, 2013; Disponível em: <https://www.google.com.br/search?q=vriesea+saundersii>)

Entretanto, após análise de um vasto material, envolvendo plantas vivas em cultivo e na natureza, além de exsicatas e fotografia de exsicatas, foi possível verificar diferenças significativas no aspecto geral entre as duas espécies. Essa constatação foi crucial no resgate da concepção de Mez (1984 – 1935), no tratamento de *V. saundersii* (Carrière) como uma espécie independente de *V. botafogensis* Mez, a qual vigora até os dias de hoje (Leme & Costa, 1994).

Espécies não ameaçadas, quando confundidas com espécies em risco, podem mobilizar projetos conservacionistas e alavancar recursos desnecessários. Por outro lado, espécies em perigo podem ficar sem proteção legal (Frankham *et al.*, 2004). Logo, é de fundamental importância que se tenha uma exatidão taxonômica da espécie estudada, uma

vez que os dados gerados poderão subsidiar estudos visando futuras tomadas de decisão sobre o manejo das espécies em questão (Frankham *et al.*, 2004).

A concepção de Mez, que vigora até o presente momento, amparada com dados gerados por um robusto estudo morfológico (Leme & Costa, 1994) pode ser aperfeiçoada com informações de base genética, permitindo uma avaliação mais consistente de ambas as espécies, e subsidiando ações conservacionistas condizentes à real situação taxonômica de ambas, sejam como espécies distintas ou como populações pertencente a mesma espécie.

Uma vez descartada a possibilidade de *V. botafogensis* Mez e *V. saundersii* (Carrierè) serem uma mesma espécie, por meio de uma avaliação combinada de dados morfológicos com dados genéticos, é possível subsidiar medidas de conservação condizentes com o verdadeiro grau de ameaça de cada espécie. As populações remanescentes conhecidas de *V. botafogensis* apresentam um reduzido número de indivíduos, somado ao fato de sua área de ocorrência limitar-se à somente três *inselbergs* localizados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro (Martinelli & Moraes, 2013). Já as populações de *V. saundersii*, embora também esteja enquadrada como criticamente em perigo, apresentam uma distribuição mais ampla no RJ, abrangendo as áreas da Pedra da Gávea, Barra da Tijuca, Corcovado, Estrada das Canoas e Furnas (Leme & Costa, 1994). Dessa forma, uma sinonimização entre as duas espécies poderia trazer sérios prejuízos, principalmente a *V. botafogensis*, que se encontra mais ameaçada do que *V. saundersii*.

1.5 Diversidade Genética

Diversidade genética é a variação de alelos e genótipos presentes em populações, espécies ou grupos de espécies (Frankham *et al.*, 2004). A variabilidade genética é de

extrema importância para a conservação, pois permite que as populações se adaptem às oscilações ambientais, em um meio em constante modificação (Primack *et al.*, 2001). A perda da diversidade genética acarreta na redução do potencial evolutivo das espécies, o que influencia no sucesso reprodutivo das mesmas (Frankham *et al.*, 2004). Essa diversidade pode ser manifestada por diferenças sutis na sequência de DNA, que podem ocasionar em variações nas funções bioquímicas, morfológicas ou comportamentais de uma espécie (Frankham *et al.*, 2004).

A genética da conservação é uma abordagem no estudo da biodiversidade, inserida atualmente no contexto da biologia da conservação (Primack *et al.*, 2001). Constitui-se como um campo de estudo que atua com base em análises genéticas moleculares, na qual apresenta como um dos principais objetivos elucidar aspectos da biologia das espécies considerados relevantes para o manejo e conservação das mesmas (Frankham *et al.*, 2008).

Dentre os vários campos estudados na genética da conservação, podemos destacar diversos processos, tais como: perda da diversidade genética e aptidão para resistir a oscilações ambientais; fragmentação das populações, fluxo gênico; endogamia e seus efeitos deletérios sobre reprodução e sobrevivência; atuação de processos estocásticos em relação a processos evolutivos; definição de unidades de manejo; uso de marcadores moleculares para elucidar questões forenses; acúmulo de mutações deletérias e resoluções de incertezas taxonômicas (Frankham *et al.*, 2008).

Questões estocásticas, como a intensificação dos efeitos da deriva genética em populações pequenas, distanciamento geográfico e aumento dos níveis de endocruzamento, somadas a processos de fragmentação, podem alterar a estrutura genética de populações, como as dos vegetais. Para esse grupo, a conservação do sistema reprodutivo é essencial, pois a determinação da estrutura genética em populações vegetais se dá pelo movimento

de genes via pólen e semente, podendo comprometer a existência da espécie numa dada localidade. Dessa forma, estudos que visam a compreensão da estrutura genética e da dinâmica de dispersão de pólen e semente são essenciais no estabelecimento de planos de manejo de conservação apropriados (Moura & Gomes, 2014).

Para se medir os níveis de diversidade genética, cálculos como de frequência alélica, número de alelos e heterozigosidade são realizados, fazendo uso de técnicas moleculares, tais como eletroforese de aloenzimas ou genotipagem de microssatélites, com ampla aplicação em estudos de espécies tropicais (Frankham *et al.*, 2004). Tais estudos direcionados à família Bromeliaceae têm utilizado preferencialmente marcadores microssatélites nucleares, seguido de aloenzimas, sendo menos freqüente os marcadores moleculares dominantes (Zanella *et al.*, 2012).

1.6 Ferramentas aplicadas a genética da conservação

Nos últimos anos, com o surgimento das tecnologias modernas de biologia molecular, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia de polimerase (PCR) e do sequenciamento automatizado, diversas classes de marcadores moleculares foram desenvolvidos, sendo prontamente incorporados como ferramenta de estudo para uma série de análises genéticas em plantas (Faleiro *et al.*, 2007).

Atualmente existe um grande número de tecnologias de genética molecular disponíveis para a obtenção destes marcadores moleculares, tais como isoenzimas, RAPD, RFLP, microssatélites, AFLP e minissatélites. A aplicação da tecnologia mais apropriada depende do tipo de trabalho a ser realizado. De modo geral, marcadores moleculares

multilocos, tais como os microssatélites, são mais apropriados para estudos de diversidade genética e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie (Hoffmann *et al.*, 2006).

Esses marcadores microssatélites compreendem sequências simples repetidas (*Simple sequence repeats*, SSR) presentes em regiões codantes ou não codantes do genoma de organismos procariotos e eucariotos (Medeiros *et al.*, 2006). As regiões que flanqueiam os microssatélites são conservadas em indivíduos da mesma espécie ou gênero. Dessa forma, pequenas diferenças no número de repetições caracterizam polimorfismo (Faleiro *et al.*, 2007).

Esses marcadores apresentam como características vantajosas: distribuição por todo genoma; multialélicos; co-dominantes; fácil exequibilidade, uma vez desenvolvidos *primers* para espécie em estudo; e intenso polimorfismo (Buso *et al.*, 2003). Entretanto, também há desvantagens, tais como: alto investimento inicial para obtenção dos *primers*; dificuldade na obtenção das sequências a serem utilizadas como *primers*, bem como a utilização de um tempo considerável para o desenvolvimento dos mesmos (Moller *et al.*, 2014).

Para obter as sequências dos *primers* a serem utilizados é necessária a criação de bibliotecas genômicas, seguido pela seleção de clones, fazendo uso de sondas com sequências repetidas. Uma vez selecionados os clones, os mesmos são sequenciados para posterior triagem da utilização dos marcadores localizados (Buso *et al.*, 2003). Na atualidade também existem tecnologias de sequenciamento de Nova Geração – Next Generation Sequencing- (NGS) - que permitem a obtenção desses marcadores, tendo em vista acelerar e baixar o custo do processo de sequenciamento, realizando uma leitura de até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo (Varuzza *et al.* 2013).

Após a obtenção dos *primers* essas regiões são amplificadas por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilita a amplificação *in vitro* destes fragmentos. Os segmentos amplificados são separados por diferença de potencial elétrico em uma matriz de poliacrilamida, permitindo a distinção por migração dos fragmentos quanto ao peso molecular (Faleiro *et al.*, 2013). Alternativamente as sequências amplificadas podem ser marcadas por fluoerescência e submetidas à uma eletroforese em capilar utilizando um sequenciador automático (Zaros *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estimar a variabilidade genética das três populações remanescentes de *V. botafogensis* conhecidas.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Genotipar, utilizando marcadores microssatélites nucleares, as três populações remanescentes de *V. botafogensis* conhecidas e comparar com uma população de *V. saundersii* de um *inselberg* adjacente;
- 2- Realizar uma análise filogeográfica empregando seqüenciamento de quatro locos do cpDNA;
- 3- Avaliar os níveis e os padrões de organização da diversidade genética entre estas populações;
- 4- Estimar outros parâmetros importantes para se avaliar os riscos de extinção da espécie, como a similaridade genética entre as populações, o coeficiente de endocruzamento e índices de estruturação genética;
- 5- Subsidiar estratégia para a conservação e manejo da espécie;

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em etapas, desde as atividades de coleta até a consolidação desta dissertação. Para cada etapa houve a participação de um ou mais integrantes pertencentes à equipe do Grupo de Pesquisa em Biodiversidade Molecular Vegetal da UNIRIO. A atuação de cada co-autor em uma ou mais etapas do projeto segue registrada na tabela 1.

Tabela 1: Participação dos co-autores envolvidos no desenvolvimento do trabalho de dissertação.

Etapas do projeto	Participação dos co-autores
Coordenação do projeto	Fabiano Salgueiro e Adriana Salgueiro
Coletas	Fabiano Salgueiro, Adriana Salgueiro, Guilherme Mello e colaboradores
Extração de DNA	Michelle Carvalho, Guilherme Mello e Gabriela Marinho
Ajuste das condições dos locos nucleares	Guilherme Mello
Ajuste das condições dos locos do cpDNA	Michelle Carvalho e Gabriela Marinho
Genotipagem dos oito locos Microssatélites Nucleares	Michelle Carvalho e Guilherme Mello
PCR e Seqüenciamento do quatro locos do cpDNA	Michelle Carvalho e Gabriela Marinho
Análise dos dados	Michelle Carvalho
Redação da dissertação	Michelle Carvalho

3.1 Coleta do material

Amostras foliares frescas de *V. botafogensis* foram coletadas em três locais na região metropolitana do Rio de Janeiro, em afloramentos rochosos (*inselbergs*) à leste e à oeste da Baía de Guanabara (Figura 3 e 4). À leste, a espécie concentra-se na Serra da Tiririca (Itacoatiara, Niterói - RJ), na qual foram coletadas amostras de 60 indivíduos. À oeste, a *V. botafogensis* distribui-se no Parque Estadual da Chacrinha, cujos os indivíduos amostrados também foram 60, e no Pão de Açúcar (Urca – RJ), tendo seus indivíduos amostrados em igual número. Entretanto, o número amostral utilizado neste trabalho foi de 30 indivíduos para cada população (Tabela 2), devido ao baixo rendimento no processo de amplificação das populações de Pedra da Gávea e Pão de Açúcar.

Da população de *V. saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez, localizadas na Pedra Bonita (Gávea-RJ), também foram coletadas amostras foliares frescas de 60 indivíduos, dentre os quais 30 foram utilizados neste trabalho (Tabela 2). Para ambas as espécies, a distribuição geográfica de cada população foi registrada através de um GPS.

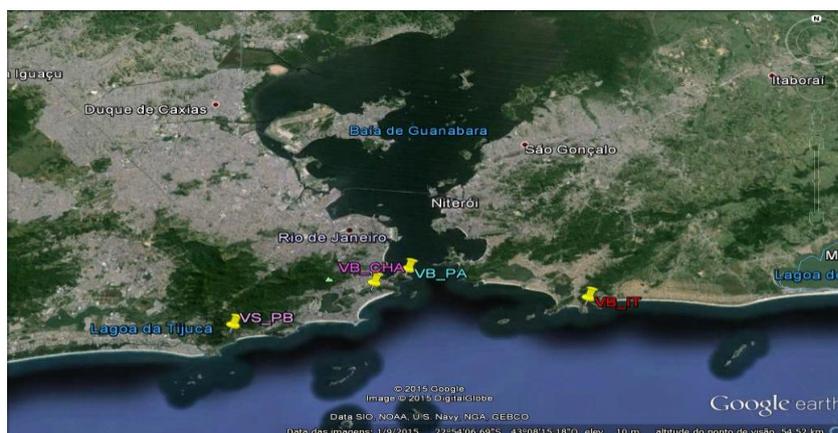


Figura 3: Mapa contendo os locais de coleta que perfazem o litoral da região metropolitana do RJ (Google earth, 2015).



Figura 4: Locais de ocorrências das populações estudadas: 1 – Pão de Açúcar (Urca – RJ), Foto: Salgueiro, 2013; 2 – Parque Estadual da Chacrinha (Copacabana – RJ), Foto: Salgueiro, 2013; 3 – Pedra Bonita (Gávea – RJ), Foto: Salgueiro, 2014 e 4 – Serra da Tiririca (Itacoatiara – RJ), Foto: Salgueiro, 2014.

Tabela 2: Relação das populações junto ao código e ao número amostral utilizado neste estudo, com seus respectivos dados de localização geográfica.

Espécie	População	Código	Nº amostral	Latitude	Longitude
<i>V. botafogensis</i>	Itacoatiara	VB_IT	30	22°58'38.0"S	43°01'42.2"W
	Parque da Chacrinha	VB_CHA	30	22°57'41.9"S	43°10'44.6"W
	Pão de Açúcar	VB_PA	30	22°56'56.7"S	43°09'17.3"W
<i>V. saundersii</i>	Pedra Bonita	VS_PB	30	22°59'13.0"S	43°16'43.9"W

3.2 Extração e quantificação do DNA genômico

A maior parte das amostras coletadas foram armazenadas e conservadas em um freezer à -80 °C para posterior uso no processo de extração, sob a ação do Nitrogênio líquido. Uma parcela das amostras foi conservada em sílica, para realização do processo de extração através de um macerador mecânico, embora o protocolo (detergente catiônico CTAB) tenha sido o mesmo para ambos os procedimentos (Doyle & Doyle, 1987).

Para a realização da primeira etapa do processo de extração, amostras de material foliar foram colocadas em tubos de 50 ml do tipo *falcon* e cobertas com sílica. Após cerca de 48 horas uma quantidade próxima de 100 mg de cada amostra, já efetivamente seca, foi transferida para tubos de microcentrífuga de 2,0 µL e submetidas ao processo de maceração em um aparelho mecânico TissueLyser LT (QIAGEN). No caso das amostras submetidas

à ação do nitrogênio líquido, a etapa de secagem em sílica não se faz necessária, uma vez que as amostras foram imediatamente acondicionadas em um suporte de cerâmica (cadinho) e maceradas manualmente, com auxílio de um pistilo, resultando em amostras pulverizadas.

As amostras maceradas foram submetidas à segunda etapa, na qual foram ressuspendidas em 600 μ L de Tampão de extração, previamente preparado, contendo os seguintes reagentes: 1g de Polivinilpirrolidona – PVP à 2% (m/v); 2 ml de Ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA, em uma solução à 20mM, 5 ml de Tris-HCl pH 8,0 em uma solução à 100mM; 4.06 g de Cloreto de sódio – NaCl (1.4 M), 1 g de Cetyltrimethylammonium bromide – CTAB à 2% (m/v) e 2 μ L de 2-mercaptoetanol 0,2% (v/v) por amostra, para um volume final de 50 ml, adicionado imediatamente antes do uso. As amostras previamente ressuspendidas no tampão de extração foram incubadas à 65 °C, em banho-maria, sendo homogeneizadas em intervalos de 10 minutos em um período de 60 minutos, para então seguirem para terceira fase, realizada, em sua totalidade, na capela de exaustão.

Na terceira etapa foram adicionadas às amostras 700 μ L do solvente orgânico, clorofórmio - álcool isoamílico (24:1). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 22.000 g à 4 °C por 5 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, e a fase inferior desprezada. Esse processo se repetiu por mais duas vezes, para a efetiva remoção dos componentes celulares indesejáveis.

Na quarta etapa foi adicionado ao sobrenadante, contendo a fase aquosa, 60 μ L de uma solução de precipitação contendo Cetyltrimethylammonium bromide – CTAB 10% (m/v) com NaCl à 1,4 M. Em seguida, foi adicionado 400 μ l de álcool isopropanol frio. Para finalizar o processo de extração no primeiro dia, os tubos de microcentrífuga foram

incubados em um freezer a - 20°C, por cerca de 16 horas para precipitação dos ácidos nucléicos.

A quinta etapa foi iniciada com a centrifugação das amostras em uma rotação a 22.000g à 4 °C por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) mantido no fundo do tubo. Iniciando o processo de lavagem, foi adicionado 1 ml de álcool 70% à cada amostra, sendo, posteriormente, centrifugado por 22.000g à 4 °C por 5 minutos. Essa etapa de lavagem com álcool 70% se repetiu mais uma vez, sendo complementada por uma única lavagem com 1 ml de álcool absoluto, seguindo as mesmas condições da última centrifugação. Por fim, após a última lavagem, foi desprezado o sobrenadante e adicionado ao *pellet* 50 µL de uma solução de RNase em concentração de 10 µg/µL

Após o processo de extração, o DNA extraído foi quantificado comparando-se a amostras comerciais, cujas concentrações já foram determinadas. Para isso, 4 µL de DNA foi adicionado em uma solução contendo 6 µL de tampão de amostra (ABF/Xileno dar a composição), e 0.5 µL do corante Gel Red™ diluído 1000X. A solução de 10 µL foi aplicada em uma matriz de agarose, cuja concentração utilizada foi de 0,8% em uma solução tampão TAE 0,5 X (TRIS Base 20 mM, Ácido Acético 10 mM e EDTA 5 mM).

O gel, submetido a corrente elétrica de 120 V, contendo o resultado da corrida das eletroforese foi colocado em um transiluminador (BioAgency), na qual pôde ser observada, após exposição à luz ultravioleta, uma fotografia com o padrão de peso molecular λPstI e as amostras de interesse. A partir da imagem digitalizada, foi possível estimar o tamanho do DNA das amostras recém-extraídas, fazendo uso de uma série de padrões de peso molecular de concentrações conhecidas (25 ng/µL, 12,5 ng/µL, 6,25 ng/µL e 3,125 ng/µL)

do DNA do bacteriófago Lambda. O DNA quantificado à 3 ng/ μ L foi, por fim, diluído 10 X (0.3 ng/ μ L) e estocado em um freezer à -20°C.

3.3 Análises utilizando marcadores microssatélites nucleares

3.3.1. Seleção dos marcadores microssatélites Nucleares (nSSR)

Para análise das regiões simples repetidas (SSR – *Simple sequence Repeats* ou microssatélites), foram utilizados oito locos desenvolvidos para outras espécies de Bromeliaceae que foram previamente testados e selecionados pelo nosso grupo de trabalho. São eles: *Vg04*, *VgB10*, *VgF01*, *Ai4.03*, *VgC01*, *PaZ01*, *VgF02* e *e6* (tabela 3)

Tabela 3: Relação dos locos empregados neste estudo, espécies de origem, faixa de tamanho (pb) e motivo dos microssatélites

Locos	Motivo de repetição	Faixa de tamanho	Espécie de origem
<i>e6</i>	(CAA) ₁₄	148	<i>Pitcairnia albiflos</i> (Paggi <i>et al</i> , 2008)
<i>VgF02</i>	(CT) ₁₂ (CT) ₁₇	176 – 204	<i>Vriesea gigantea</i> e <i>Alcantarea imperialis</i> (Palma-Silva <i>et al</i> , 2007)
<i>PaZ01</i>	(AG) ₂₀	185 – 199	<i>Pitcairnia albiflos</i> (Paggi <i>et al</i> , 2008)
<i>VgC01</i>	(CT) ₁₆	208 – 218	<i>Vriesea gigantea</i> e <i>Alcantarea imperialis</i> (Palma-Silva <i>et al</i> , 2007)

<i>Ai4.03</i>	(AT) ₅ (GA) ₅ (TC) ₄ (TA) ₅	191 – 195	<i>Vriesea gigantea</i> e <i>Alcantarea imperialis</i> (Palma-Silva <i>et al</i> , 2007)
<i>VgF01</i>	(CT) ₁₇	154 – 199	<i>Vriesea gigantea</i> e <i>Alcantarea imperialis</i> (Palma-Silva <i>et al</i> , 2007)
<i>VgB10</i>	(AG) ₂₄	119 – 156	<i>Vriesea gigantea</i> e <i>Alcantarea imperialis</i> (Palma-Silva <i>et al</i> , 2007)
<i>VgA04</i>	(TC) ₆ (CT) ₁₁ (TC) ₁₆	187 – 215	<i>Vriesea gigantea</i> e <i>Alcantarea imperialis</i> (Palma-Silva <i>et al</i> , 2007)

3.3.2. PCR das amostras

A amplificação dos oito locos selecionados foi realizada com base na reação em cadeia de polimerase (PCR) em um termociclador (Biocycler), a partir de alíquotas de 2.5 μL de Tampão 10 X PCR (NH_4SO_4) Thermo Scientific, 2.0 μL de MgCl_2 (25mM) Fermentas, 0.8 μL de dNTPs (5mM), 0.2 μL de Taq. DNA pol (50U/ μL) Fermentas, 1.25 μL de BSA (20 mg/mL), 0.1 μL de Primer Forward (10 μM) com cauda M13, 0.4 μL de Primer Reverse (10 μM) e 14.45 μL de H₂O MiliQ, totalizando um volume final de reação de 25 μL .

Para as amplificações foram utilizados dois programas em sequência, o primeiro visando a amplificação do material e o segundo visando a incorporação do fluoróforo. Para o primeiro programa foram estabelecidas as seguintes condições de ciclagem: 95° por 5 minutos; seguida de 10 ciclos de 95° por 15 segundos, touchdown de 55° a 45° por 15 segundos e 95° por 15 segundos; e 20 ciclos de 95° por 15 segundos, 45° por 15 segundos

e 72° por 15 segundos. Enquanto que para o segundo programa foi estabelecido as seguintes condições de ciclagem, após a adição de 2.0 μ L de cada um dos *primers* marcados com um fluoróforo: 95°C por 15 segundos; 8 ciclos de 53°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos; com uma fase final de extensão a 72°C por 30 minutos.

A estratégia de amplificação e genotipagem adotada no estudo baseou-se na utilização de *primers* complexados à moléculas fluoróforas. Em cada reação, foi utilizado um primer *Forward* acrescido com uma extensão ou “cauda” M13, um *primer* não modificado do tipo *Reverse*, e um *primer* marcado com um fluoróforo, de sequência complementar à extensão M13 conforme descrito por Schuelke (2000). Dessa forma, para a genotipagem utilizando um seqüenciador automático de capilar, os mesmos indivíduos de cada população puderam ser sobrepostos em uma única placa de 96 poços, sem comprometer a informação individual de cada amostra, uma vez que os picos de luminescência gerados pelas moléculas fluoróforas emitem luz em comprimentos de ondas diferentes. Os marcadores fluorescentes utilizados no método foram o 6-FAM™, VIC®, NED™ e PET®, constituintes do set de corantes (Dye Set) DS-33™, (Applied Biosystems).

Para a visualização do resultado obtido na PCR foi preparada uma solução contendo 4.0 μ L do DNA amplificado, 1.0 μ L de tampão de amostra ABF/Xileno, 0.5 μ L de Gel Red® diluído 500X e 4.5 μ L de Água MiliQ, totalizando 10 μ L. Esta mistura foi aplicada em um gel de agarose 2,0% (m/v) em tampão TAE 0,5X.

3.3.3. Genotipagem dos Marcadores Microssatélites Nucleares

As amostras foram enviadas para serem genotipadas por uma empresa terceirizada (MACROGEN[®], Coréia do Sul) A genotipagem foi realizada em plataforma Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. Os resultados foram analisados utilizando-se o software PeakScanner2 (Applied Biosystems). Para análise do tamanho dos fragmentos amplificados, cada amostra foi comparada com o padrão de tamanho molecular LIZ500 apropriado para o sequenciador em questão.

Para a análise dos resultados da genotipagem foram observados manualmente os picos de luminescência, retratados nos gráficos e visualizados através do programa PeakScanner2, cuja a presença de um único pico pronunciado indica homozigose, enquanto a presença de dois picos indica heterozigose. Os alelos de cada indivíduo para cada loco foram registrados em uma planilha Excel de acordo com o tamanho (em pb) de cada fragmento.

3.3.4 Análise dos dados (nSSR)

3.3.4.1. Análise descritiva da diversidade genética

Foram calculados, por meio do programa MSA (Dieringer e Schlotterer, 2003) os seguintes parâmetros: frequência alélica (F_a) riqueza alélica (R_a), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), número absoluto de alelos (N_a) e número de alelos privados (A_p). Também foram calculados os índice de endogamia (f) e valores de F_{IS} (correspondente ao f) pelo programa FSTAT (Goudet, 1995), e as amostras foram

submetidas ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EqHW) utilizando o programa TFPGA (Miller, 1997).

3.3.4.2. Análise de estruturação genética

Para analisar a partição genética entre e dentro das populações foi utilizado o método de quantificação baseado na estatística- F (Wright, 1988). Esses valores foram calculados pelo programa MSA através do método de Weir e Cockerham (1984), tendo o seu grau de significância obtido por meio de 10.000 permutações, de acordo com Dieringer e Schlotterer (2003). Foi realizado o cálculo do número de migrantes (N_m) por geração, com base nos valores de F_{STn} obtidos previamente. Uma análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada utilizando o programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier, 2005) afim de avaliar a distribuição da variação genética dentro e entre as populações.

Foi realizado o teste de Mantel através do programa TFPGA (Miller, 1997) afim de avaliar a correlação entre a distância genética e a distância geográfica das populações amostradas. Dessa forma, foi estabelecida uma matriz de distância genética, representadas pelos valores de F_{ST} , calculados previamente, e uma matriz de distância geográfica, expressa em quilômetros (km), conforme pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4: Comparação par a par das distâncias geográfica (km) entre as populações analisadas.

Populações	VB_ITA	VB_CHA	VB_PA	VS_PB
VB_ITA	-	-	-	-
VB_CHA	17,4	-	-	-
VB_PA	15.0	2.7	-	-
VS_PB	26.2	9.3	11.08	-

As distâncias genéticas par a par entre as populações foram obtidas com base no método de distância de Nei (1978) utilizando o programa TFPGA (Miller, 1997). Esses valores foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética utilizando o método do UPGMA (Swofford and Olsen, 1990) utilizando o programa TFPGA (Miller, 1997).

Foi realizada uma análise bayesiana através do programa STRUCTURE 2.0 (Pritchard, Stephens e Donnelly, 2000 e Falush, Stephens e Pritchard, 2003). A partir desse método foi possível verificar a composição genética das populações, desconsiderando dados geográficos na análise. Esta análise foi realizada sob o método de mistura (*admixture model*) assumindo-se frequências alélicas independentes, em um período de 3 “burn-in” de 1.000 permutações com 1 interação para cada K, que variou de 1 à 8.

A interpretação dos resultados foi realizada a partir dos valores de ΔK estimados pelo método sugerido por Evanno (2005), implementado pelo programa STRUCTURE. Logo, o número de grupos genético (K) e a proporção das misturas (Q) inferidas para cada *cluster* foi estimado tendo como base os maiores valores de ΔK .

3.4 Análises utilizando sequenciamento de locos do cpDNA.

3.4.1. Amplificação e sequenciamento dos locos do cpDNA

Inicialmente foram testados *primers* previamente descritos na literatura capazes de amplificar oito locos: *psbA-trnH*, *trnL*, *ycf5*, *rpoB*, *rpoC*, *rbcL*, *atpH-atpI* e *matK* (Vijayan *et al.*, 2010). Sendo assim, dos oito *primers* testados, os locos *matK*, *rpoB*, *rpoC* e *atpH-atpI* foram selecionados para o presente estudo, pois foram os únicos que apresentaram polimorfismo.

Para amplificação do loco *atpH-atpI* foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem no termociclador: 94°C por 5 minutos; seguida de 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, touchdown de 50°C a 45° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto; seguido de 30 ciclos a 94° C por 1 minuto 45° C por 1 minuto, 72° por 1 minuto, e 72° C por 1 minutos; seguido de uma fase de extensão final a 72° C por 5 minutos. Os *primers matK*, *rpoB* e *rpoC* compartilharam as mesmas condições de amplificação: 95° C por 5 minutos; 35 ciclos de 95° C por 1 minuto, 48° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto; e uma fase final de extensão a 72° C por 1 minuto.

As amostras foram amplificadas utilizando-se alíquotas de 2.5 µL de Tampão 10x (NH₄SO₄) Thermo Scientific, 2.0 µL de MgCl₂ (25mM) Fermentas, 0.8 µL de dNTPs (5mM), 0.2 µL Taq. DNA Polimerase (5U/µL), 1.0 µL de BSA (20 mg/ml), 0.8 µL de Primer Forward (10 µM), 0.8 µL de Primer Reverse (10 µM), 2.0 µL de DNA (3 ng/µL) e 14.50 µL de H₂O MiliQ. Para a visualização do resultado da PCR foi realizado o processo de eletroforese em gel de agarose 2,0% (m/v) em tampão TAE 0,5X. As reações de

purificação dos produtos das PCRs e sequenciamentos foram realizadas por uma empresa terceirizada (MACROGEN[®], Coréia do Sul).

3.4.2. Edição e alinhamento das sequências de cpDNA

Foram obtidas uma sequência *Forward* (“F”) e uma *Reverse* (“R”) para cada uma das amostras sequenciadas. As sequências e seus respectivos eletroferogramas foram conferidos manualmente utilizando o programa Chromas 2.4, afim de evitar artefatos introduzidos pelo método de sequenciamento. As sequências consenso foram alinhadas utilizando o ClustalW (Thompson *et al.* 1994) disponível no programa MEGA 5.2.1, e os locos que apresentavam mutações maiores que um nucleotídeo foram codificados como um único passo mutacional, afim de evitar uma superestimativa da variação entre as sequências.

3.4.3. Análise dos dados (cpDNA)

Os diferentes haplótipos encontrados foram definidos utilizando o programa DnaSP (Librado e Rozas, 2009). A diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram calculadas utilizando o programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier e Lischer, 2010). A rede de haplótipos foi construída utilizando-se o método de distância *Median-joining networks* (Bandelt; Foster; Rohl, 1999) implementado no programa NETWORK 4.6.1.3.

Foi realizado uma análise molecular de variância espacial através do programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup; Schneider; Excoffier, 2002), afim de definir os grupos a serem empregados na análise molecular de variância (AMOVA). Essa análise foi realizada pelo

programa ARLEQUIN 3.1, afim de avaliar a distribuição da variação genética entre as populações. Foi obtido um valor de F_{ST} específico para o conjunto de dados, a partir da definição das quatro populações como pertencentes a um único grande grupo.

O programa Permut (Pons e Petit, 1996) foi utilizado para estimar a diferenciação genética entre as populações, considerando apenas as frequências dos haplótipos (G_{ST}), e considerando também as distâncias genéticas entre os haplótipos (N_{ST}). Foi calculado com base na fórmula desenvolvida por Ennos (1994), a razão do pólen e semente, através dos valores de F_{STn} e F_{STc} obtidos previamente.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados nSSR

4.1.1 Análise descritiva da diversidade genética

Os dados obtidos após a genotipagem de quatro locos microssatélites (*Ai4.03*, *VgA04*, *VgB10* e *VgF01*) dos indivíduos da população VB_IT não puderam ser interpretados, uma vez que os eletroferogramas não apresentaram sinal. Como os produtos das PCRs foram claramente observados no gel de agarose, provavelmente não houve a correta incorporação dos fluoróforos nestas reações. Os genótipos destas amostras, para estes quatro locos, foram codificados como “dados faltantes” em todas as análises,

Foi acrescentado à todas as populações deste estudo, os resultados da genotipagem de mais seis indivíduos realizados em um estudo prévio conduzido pelo nosso grupo de trabalho. Dessa forma, o número amostral tornou-se maior (N=30) para todas as populações. A frequência alélica dos quatro locos que não apresentaram sinal da população de Itacoatiara foi calculada tendo como base estes seis indivíduos deste estudo prévio.

Os índices de diversidade genética foram calculados para as três população de *V. botafogenses* e para uma população de *V. saundersii*. Conforme pode ser observado na tabela 5. O número absoluto de alelos variou de dois (loco *e6*) a 15 (loco *VgF02*).

Tabela 5: Valores de frequência alélica por loco nas quatro populações analisadas por este estudo.

LOCO	ALELO	FREQUÊNCIA ALÉLICA EM CADA POPULAÇÃO				
		VB_IT	VB_CHA	VB_PA	VS_PB	
e6	138	-	1.00	1.00	1.00	
	145	1.00	-	-	-	
VgC01	229	-	-	-	0.02	
	231	-	-	-	0.02	
	236	0.25	0.71	0.81	0.48	
	238	0.75	-	-	-	
	240	-	0.21	0,19	-	
	242	-	0.04	-	0.48	
	249	-	0.04	-	-	
	PaZ01	161	-	0.66	0.20	-
PaZ01	163	-	0.04	0.02	-	
	172	-	-	-	0.02	
	173	1.00	-	-	-	
	174	-	-	-	0.02	
	184	-	-	-	0.36	
	186	-	-	--	0.60	
	187	-	0.10	-	-	
	189	-	0.20	0.78	-	
	VgF02	173	0.01	-	-	-
	VgF02	175	0.11	-	0.08	-
177		0.38	0.08	0.08	-	
178		0.02	0.02	-	-	
179		0.36	0.14	-	-	
181		0.07	0.05	-	0.05	
183		-	-	-	0.28	
185		-	-	-	0.45	
201		-	-	-	0.03	
202		-	0.13	-	-	

	203	-	-	-	0.02
	205	-	0.14	-	-
	213	0.05	0.44	0.84	-
	223	-	-	-	0.06
	225	-	-	-	0.11
Ai4.03	139	-	-	-	0.30
	202	0.80	-	-	0.70
	204	-	1.00	1.00	-
	206	0.10	-	-	-
	208	0.10	-	-	-
VgA04	174	0.80	-	-	-
	208	-	-	0.01	-
	209	-	0.48	0.16	0.13
	211	0.10	0.50	0.50	0.39
	213	0.10	0.02	0.33	0.48
VgB10	150	-	0.06	0.07	-
	152	-	0.46	0.21	0.27
	154	-	0.14	-	0.71
	156	-	-	-	0.01
	158	-	-	-	0.01
	169	0.50	0.07	0.72	-
	171	0.50	0.27	0.72	-
VgF01	163	-	1.00	0.67	-
	173	-	-	-	0.92
	177	0.42	-	0.07	-
	179	0.50	-	0.07	-

O número absoluto de alelos (N_A) variou de 4 na população VB_PA à 7 nas demais populações. A riqueza alélica (R_S) variou de 2.24 na população de VB_PA à 3.93 na população de VB_IT. O número de alelos privados (A_P) variou de 2.0 nas populações VB_CHA e VB_PA à 14 na população de VS_PB. A heterozigosidade observada (H_O)

variou de 0.31 na população de VB_PA à 0.41 na população de VS_PB. A heterozigidade esperada (H_E) variou de 0.31 na população de VB_PA à 0.43 na população de VB_IT (Tabela 6).

Tabela 6: Índices de diversidade genética das quatro populações amostradas. N = Número de amostras genotipadas; N_A = número de alelos; R_S = Riqueza alélica A_P = Alelos privados; H_O = Heterozigidade observada; H_E = Heterozigidade esperada; f = coeficiente de endogamia (f).

	N	N_A	A_P	N_A (médio)	R_S	H_O	H_E	F
VB_IT	30	21	7	2.62	3.93	0.40	0.43	-0.22
VB_CHA	30	25	4	3.12	2.88	0.37	0.38	0.08
VB_PA	30	20	1	2.5	2.24	0.31	0.31	0.14
VS_PB	30	26	16	3.25	2.93	0.41	0.42	-0.01
Média	30	23	7	2.87	2.99	0.37	0.38	-

Em relação a heterozigidade, as populações VB_IT e VS_PB foram as mais diversas ($H_O = 0.40$ e 0.41 respectivamente), enquanto que a população VB_PA foi a menos diversa ($H_O = 0.31$). Já a população VB_CHA apresentou valores intermediários de heterozigidade ($H_O = 0.37$) (Tabela 7). Dessa forma, VB_IT e VS_PB foram as populações que apresentaram os maiores índices de diversidade e a maior quantidade de alelos privados.

Tabela 7: Valores de heterozigosidade obtido para as quatro populações estudadas. He = Heterozigosidade esperada; Ho = Heterozigosidade observada. Valores em negrito correspondem a valores elevados de He

Loco	População	Ho	He
e6	VB_IT	0.000	0.000
e6	VB_CHA	0.000	0.000
e6	VB_PA	0.000	0.000
e6	VS_PG	0.000	0.000
VgCO1	VB_IT	0.208	0.403
VgCO1	VB_CHA	0.416	0.567
VgCO1	VB_PA	0.000	0.000
VgCO1	VS_PG	0.375	0.543
PaZ01	VB_IT	0.565	0.811
PaZ01	VB_CHA	0.043	0.339
PaZ01	VB_PA	0.000	0.000
PaZ01	VS_PG	0.696	0.506
VgF02	VB_IT	0.875	0.698
VgF02	VB_CHA	0.625	0.755
VgF02	VB_PA	0.000	0.000
VgF02	VS_PG	0.571	0.664
Ai4.03	VB_IT	0.000	0.000
Ai4.03	VB_CHA	0.000	0.000
Ai4.03	VB_PA	0.000	0.000
Ai4.03	VS_PG	0.000	0.508
VgA04	VB_IT	1.000	0.510
VgA04	VB_CHA	1.000	0.511
VgA04	VB_PA	1.000	0.566
VgA04	VS_PG	0.916	0.613
VgB10	VB_IT	1.000	0.511
VgB10	VB_CHA	0.416	0.635

VgB10	VB_PA	0.333	0.387
VgB10	VS_PG	0.458	0.401
VgF01	VB_IT	1.000	0.510
VgF01	VB_CHA	0.000	0.000
VgF01	VB_PA	0.458	0.443
VgF01	VS_PG	0.000	0.000

Foi possível observar nas populações VB_IT e VS_PB que a maior parte dos locos apresentaram desvios para excesso de heterozigotos. Em contraste com as populações VB_PA e VB_CHA que apresentaram desvios para déficit de heterozigotos.

O valor médio do coeficiente de endocruzamento (f) variou de -0.22 na população VB_IT à 0.14 na população VB_PA, conforme pode ser observado na tabela 6. Os valores de F_{IS} , para todas as populações, foi significativo ($p > 0.00156$), com valores variando de 0.28 à 0.97 na população VB_IT, de 0.09 à 0.90 na população VB_CHA, de 0.01 à 0.98 na população VB_PA e de 0.49 à 0.50 na população VS_PB.

Foi observada uma menor distância genética (d) entre as populações VB_CHA e VB_PA ($d = 0,14$). Em contraste, às populações VS_PB e VB_IT apresentaram a maior distância genética ($d = 2,35$). Já as populações VB_IT x VB_CHA ($d = 1.20$), VB_IT x VB_PA ($d = 1.03$) e VB_PA x VS_PB ($d = 1.01$) apresentaram valores intermediários de distância genética (Tabela 8).

Tabela 8: Distâncias genéticas (acima da diagonal) e geográficas (abaixo da diagonal) encontradas entre os pares de populações. O maior e o menor valor de distância genética encontrados são evidenciados em negrito.

	VB_IT	VB_CHA	VB_PA	VS_PB
VB_IT	-	1.20	1.03	2.35
VB_CHA	17.4 km	-	0.14	0.97
VB_PA	15,0 km	2,7 km	-	1.01
VS_PB	26.2 km	9,3 km	11,8 km	-

O cladograma construído com base nos valores de distância genética demonstrou uma aproximação maior entre as populações VB_CHA e VB_PA. Assim como uma maior relação entre o clado formado pelas populações VB_PA e VB_CHA com a população VS_PB. Enquanto que a população VB_IT aparece mais distante das demais populações de *V. botafogensis*, conforme pode ser observado na figura 5. Entretanto, é importante ressaltar a inexistência de dados para quatro locos microssatélites na análise da população VB_IT, que pode ter maximizado o distanciamento dessa população com VB_CHA e VB_PA.

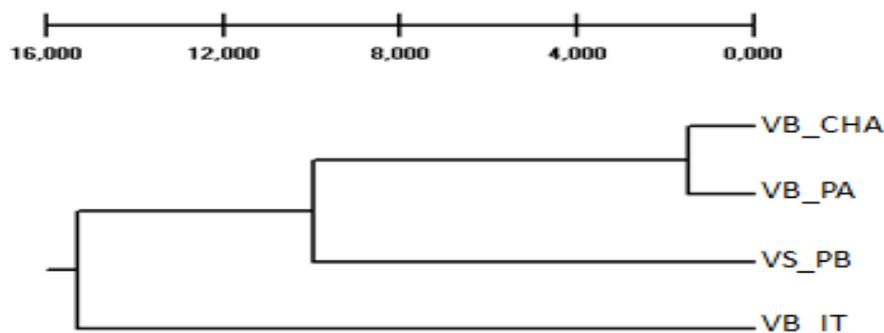


Figura 5: Árvore filogenética construída com base nos valores de distância genética pelo método de UPGMA.

4.1.2 Análise de estruturação genética

A análise molecular de variância (AMOVA) revelou que a maior parte da variação genética (74.83%) decorre da variação entre as populações e não entre os indivíduos de uma mesma população (25.16%), conforme pode ser observado na tabela 9.

Tabela 9: Teste de agrupamento das populações utilizando a análise molecular de variância (AMOVA).

Fonte de variação	Soma dos quadrados dos desvios	Componentes de variação	(%) variação	Índice (Φ)	<i>p</i> - valor
1 grupo: (VB_IT, VB_CHA, VB_PA) – (VS_PB)					
Entre as populações	36.64	1.7	74.83	$\Phi_{ST}=0.75$	0.00+- 0.00
Dentro das populações	16.58	0.59	25.16		
Total	53.22	2.35			

A análise dos índices de F_{ST} par a par revelou valores de F_{ST} de médios a altos: entre VB_CHA e VB_PA, $F_{ST} = 0.18$ ($p = 0.0006$); entre VB_IT e VS_PB, $F_{ST} = 0.55$ ($p = 0.0006$); entre VB_IT e VB_CHA, $F_{ST} = 0.52$ ($p = 0.0006$); entre VB_IT e VB_PA, $F_{ST} = 0.53$ ($p = 0.0006$); entre VB_CHA e VS_PB, $F_{ST} = 0.48$ ($p = 0.0006$); e entre VB_PA e VS_PB, $F_{ST} = 0.52$ ($p = 0.0006$).

A taxa média de migração fazendo uso do F_{STn} foi bastante reduzida ($Nm = 0.08$), assim como os valores obtidos em uma comparação par a par, conforme segue: VB_IT x VB_CHA ($Nm = 0.23$), VB_IT x VB_PA ($Nm = 0.22$), VB_IT x VS_PB ($Nm = 0.20$), VB_CHA x VB_PA ($Nm = 1.14$), VB_CHA x VS_PB ($Nm = 0.27$) e VB_PA x VS_PB ($Nm = 0.23$). É observado que o Nm entre VB_CHA e VB_PA é um pouco maior dos demais, embora ainda seja bastante reduzido, condizente com os valores altos de estruturação encontrados por este estudo.

A possível correlação entre a variabilidade genética das populações amostradas com as distâncias geográficas foi testada através de um teste de Mantel. Os resultados podem ser observados na figura 6. Foi obtido um valor alto e significativo de correlação ($r = 0.99$; $p = 0.34$), indicando a existência de isolamento por distância entre as populações.

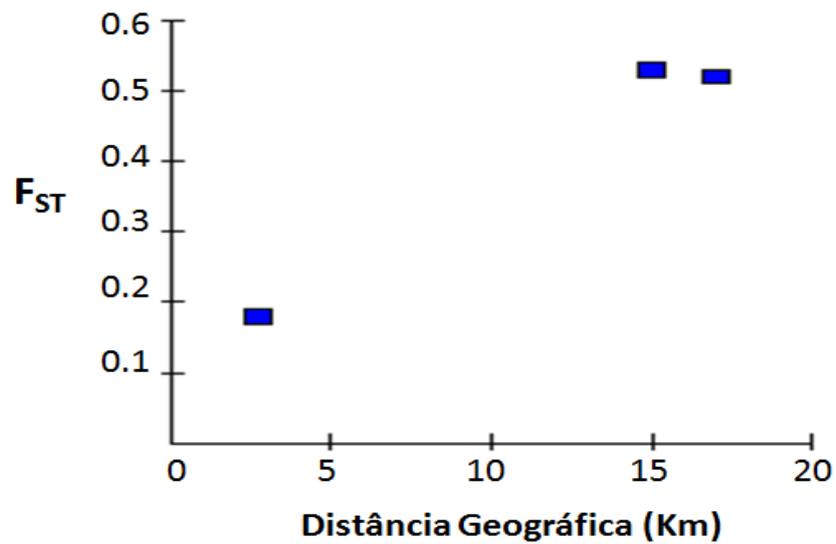


Figura 6: Gráfico obtido por meio do Teste de Mantel. Eixo x corresponde a distância geográfica, expressas em Km e eixo y corresponde a distância genética, com base nos valores de F_{ST} . Somente as populações de *V. botafogensis* foram consideradas.

A análise Bayesiana realizada no programa STRUCTURE sugere a escolha de $K = 1$ (figura 7). Entretanto, o ΔK indicativo para 2 *cluster* aproxima-se mais dos demais resultados obtidos por este estudo. Portanto, o resultado de $K = 2$ também é apresentado neste estudo.

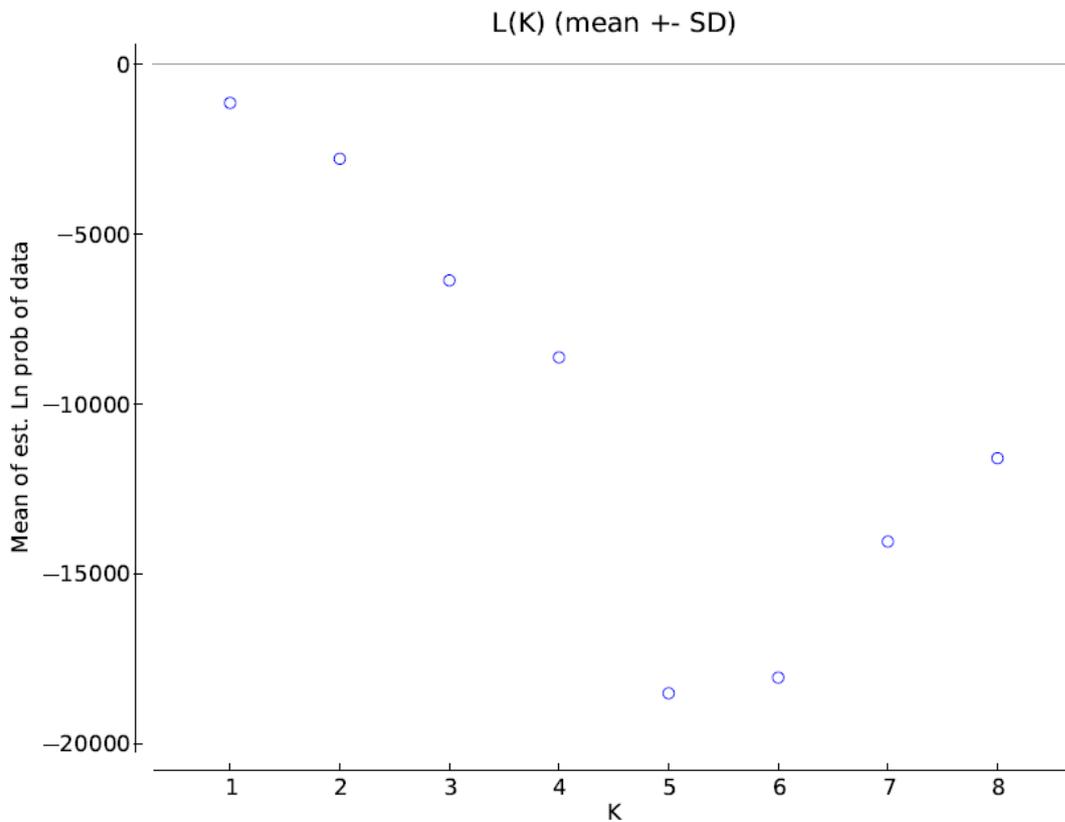
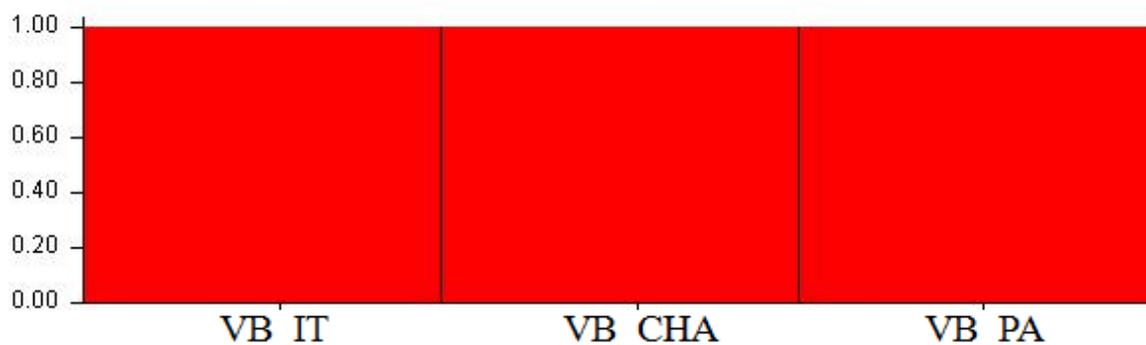


Figura 7: Valores de ΔK obtidos através da análise bayesiana considerando de $K = 1$ à $K = 8$.

Quando considerado apenas um cluster ($k=1$) as quatro populações estudadas apresentam-se como um grande grupo homogêneo (figura 8a). No caso do valor sugerido para $K = 2$, o *cluster 1* é representado pela cor vermelha e o *cluster 2* é representado pela cor verde na Figura 8b. Nesse caso, foi possível observar uma nítida separação de VB_IT das demais populações agrupadas em um único *cluster*.

a)



b)

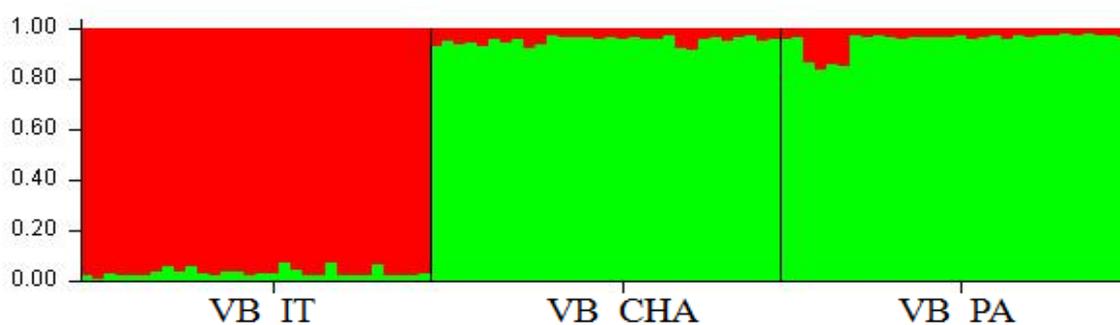


Figura 8: Proporção de mistura bayesiana dos indivíduos pertencentes às três populações de *V. botafogensis* e à população de *V. saundersii*, sob o modelo de $K = 1$ (a) e $K = 2$ (b). Cada população é estimada por uma linha vertical. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genóticas. *Cluster 1*: vermelho; *cluster 2*: verde

A média da proporção de mistura (Q), sob o modelo de $K = 1$, se deu em valor máximo para as quatro populações (Tabela 9a), uma vez que as populações foram agrupadas em um único *cluster*. Observa-se na tabela 9b, que o *cluster 1* é formado majoritariamente por indivíduos que compõem a população VS_IT ($Q = 0.964$), além de ser composto por 4.5 % de indivíduos da população VB_CHA e VB_PA ($Q = 0.045$). Já o

cluster 2 é formado majoritariamente por indivíduos da população VS_CHA e VB_PA ($Q = 0.955$), composto por 3.6% de indivíduos de VB_IT ($Q = 0.036$).

Tabela 9: Resultado da proporção de mistura (Q), sob o modelo de $K=1$ (a), $K=2$ (b) e $k=3$ (c), de cada uma das populações de *V. botafogensis* e *V. saundersii* (linhas), para cada um dos grupos genéticos (coluna) inferidos pela análise bayesiana no Structure.

a)

Populações	Cluster 1 (Q)
VB_IT	1.000
VB_CHA	1.000
VB_PA	1.000

b)

Populações	Cluster 1 (Q)	Cluster 2 (Q)
VB_IT	0.964	0.036
VB_CHA	0.045	0.955
VB_PA	0.045	0.955

4.2 Resultados das análise de sequências (cpDNA)

4.2.1 Análise descritiva da diversidade genética

Visando uma análise da diversidade genéticas do cpDNA das quatro populações do presente estudo, foram sequenciados quatro locos diferentes (*rpoB*, *rpoC*, *matK* e *atpH-atpI*) de 40 amostras, sendo 12 amostras da população VB_IT, sete amostras da população VB_CHA, 12 amostras da população VB_PA e nove amostras da população VS_PB. As

sequências obtidas para cada um dos quatro locos foram concatenadas em uma única sequência de 2.200 pares de bases (pb).

A partir de uma avaliação conjunta das sequências foi identificado um total de sete haplótipos, com 11 sítios polimórficos, e uma diversidade haplotípica alta ($h = 0.75$), resultado da presença de haplótipos singulares, em virtude da baixas taxas de compartilhamento das sequências entre as populações.

Tabela 10: Haplótipos representados pelos sítios variáveis (10 no total), junto às populações as quais pertencem. Os números da segunda linha representam a posição do sítio que contém o polimorfismo, cuja variação está representada em vermelho.

Haplótipo	Sítios polimórficos										População			
	167	333	487	949	1728	1743	1800	1948	1960	2041	VB_IT	VB_CHA	VB_PA	VS_PB
H1	G	T	C	T	T	C	T	G	C	-		X	X	
H2	G	C	T	C	T	T	-	C	C	C	X			
H3	G	C	T	C	T	C	T	G	C	-	X			
H4	G	T	C	T	T	T	-	C	C	C			X	
H5	G	T	C	T	T	T	-	C	C	C			X	
H6	A	T	T	T	G	G	A	C	-	-				X
H7	A	T	T	T	T	T	-	C	C	C	X			X

Em relação a diversidade haplotípica intrapopulacional, a população VB_PA apresentou os maiores índices ($h = 0.44$), seguida da população VB_IT ($h = 0.30$) e da população VS_PB ($h = 0.22$), em contraste à população VB_CHA, com diversidade haplotípica nula ($h = 0.00$). A diversidade nucleotídica, em geral, foi baixa para todas as populações, na qual a população de VB_PA assumiu o maior valor ($\pi = 0.000822$), seguida da população de VB_IT ($\pi = 0.000552$), da população de VS_PB ($\pi = 0.000506$), e, por último, a

população de VB_CHA ($\pi = 0.0000$). Esses valores diminutos são decorrentes da pouca ou nenhuma diferença existente entre os haplótipos, conforme pode ser observado na tabela 11.

Em relação a quantidade de haplótipos exclusivos, a população de VB_PA apresentou três haplótipos exclusivos (H1, H4 e H5), seguida pela população de VB_IT com dois haplótipos exclusivos (H1 e H4) e pela única população pertencente à espécie *V. saundersii* deste estudo ($h = 0.22$), contendo somente um haplótipo exclusivo (H6). A população VB_CHA apresentou sequências compartilhadas com a população VB_PA, na qual gerou somente um haplótipo (H1) (Tabela 11).

Tabela 11: Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) intrapopulacionais de *V. botafogensis* e *V. saundersii*. A segunda coluna corresponde ao N amostral de cada população, e a última coluna aos haplótipos exclusivos e os compartilhados entre as populações. Os números entre parênteses representam valores de desvio padrão (p -valores).

Espécie	População	N amostral	Diversidade	Diversidade	Haplótipos
			Haplótípica (h)	Nucleotídica (π)	(N)
<i>Vriesea botafogensis</i>	VB_IT	12	0.3030	0.0005	H2(10),
			(+/- 0.15)	(+/- 0.00)	H3(2)
<i>Vriesea botafogensis</i>	VB_CHA	7	0.0000	0.0000	H1(7)
			(+/- 0.00)	(+/- 0.00)	
<i>Vriesea botafogensis</i>	VB_PA	12	0.4394	0.0008	H1(9),
			(+/- 0.16)	(+/- 0.00)	H4(2), H5(1)
<i>Vriesea saundersii</i>	VS_PB	9	0.2222	0.0005	H6(8),
			(+/- 0.17)	(+/- 0.00)	H7(1)

4.2.2 Análise da estrutura populacional

A rede de haplótipos (Figura 10) revelou três grandes grupos. O primeiro formado pelos haplótipos H2 e H3 pertencentes a população VB_IT. O segundo formado pelos haplótipos H1, H4 e H5 pertencentes as populações VB_CHA e VB_PA. E um terceiro grupo formado pelos haplótipos H6 e H7 pertencente as população VS_PB. O haplótipo H6 foi o mais divergente, separado do haplótipo mais próximo (H7) por cinco passos mutacionais. Os haplótipos H1, H2, H3 e H4, presentes nas três populações de *V. botafogensis* estão mais relacionados. Enquanto que o haplótipo H5 pertencente à população VB_PA faz uma transição entre as amostras das espécies *V. botafogensis* e a população VS_PB pertencente à espécie *V. saundersii*, cuja a distância resume-se a 2 passos mutacionais. (figura 10).

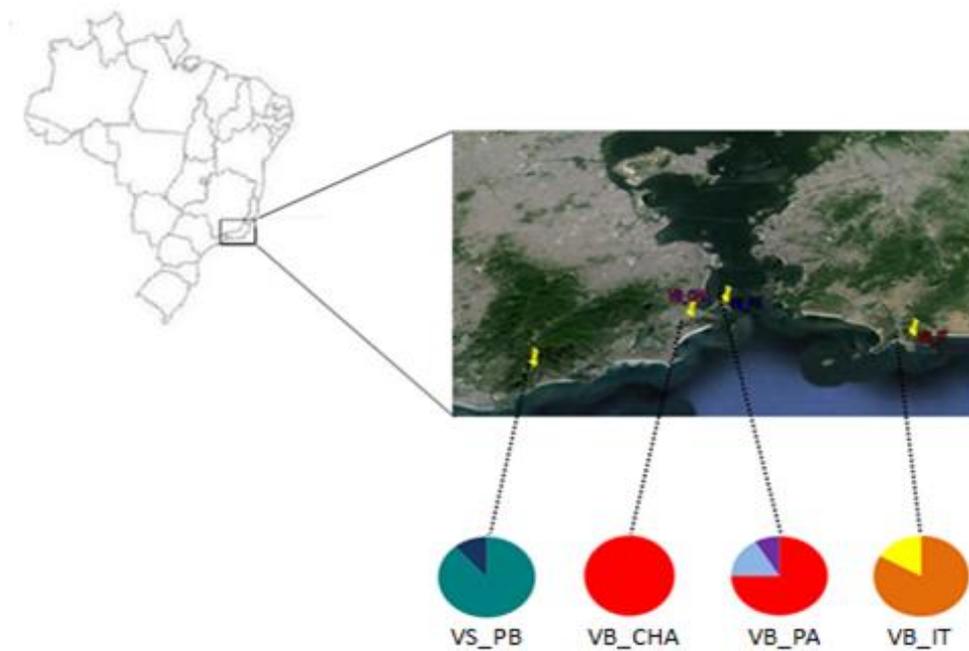
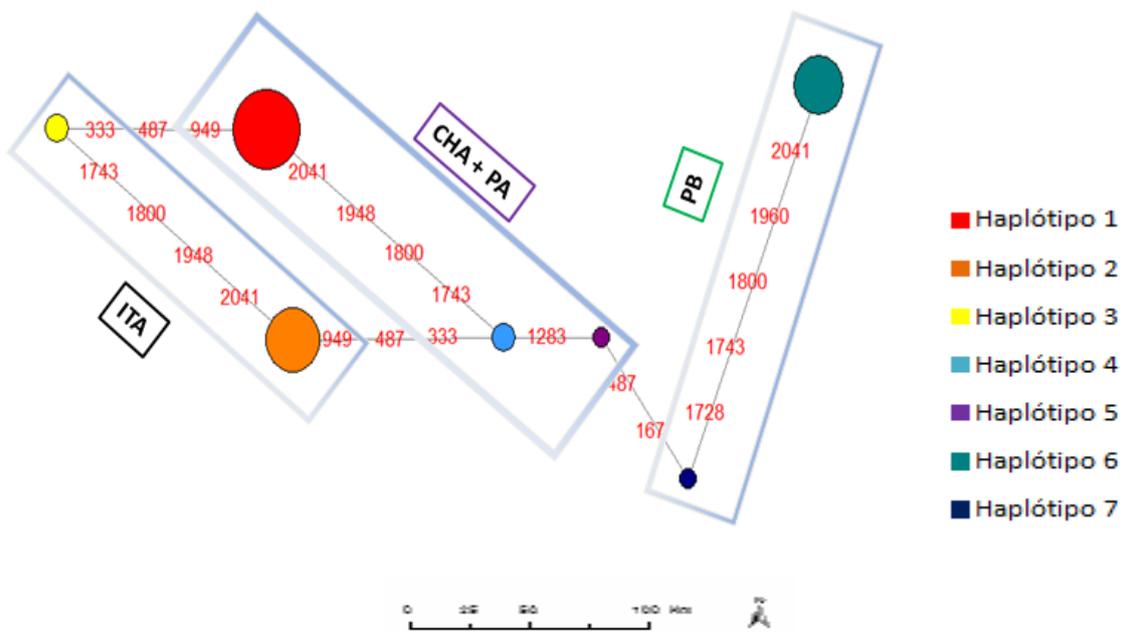


Figura 9: Rede de haplótipo contendo os passos mutacionais que separam um haplótipo do outro, bem como um mapa, contendo as populações em estudo, com seus respectivos haplótipos (Google earth, 2015).

Os valores de F_{ST} foram elevados na comparação par a par entre as populações, exceto entre a população VB_PA e VB_CHA, em virtude do compartilhamento do H1 entre as duas populações, indicando um maior fluxo gênico via sementes entre estas duas populações e um baixo fluxo de sementes entre os demais pares de populações. (Tabela 15).

Tabela 12: Valores de F_{ST} par a par entre as populações. Valores em negrito foram elevados. Os números entre parênteses representam valores de desvio padrão (p -valores).

	VB_CHA	VB_IT	VB_PA	VS_PB
VB_CHA	-	-	-	-
VB_IT	0.88 (0.00 +- 0.00)	-	-	-
VB_PA	0.09 (0.26 +- 0.00)	0.74 (0.00 +- 0.00)	-	-
VS_PB	0.92 (0.00+-0.00)	0.86 (0.00 +- 0.00)	0.80 (0.00 +- 0.00)	-

A análise espacial de variância molecular (SAMOVA), revelou quatro grupos (K = 4) à serem empregados na análise de variância molecular. Estes grupos correspondem a cada uma das quatro populações analisadas.

Para estimar a variação genética dentro e entre as populações, a análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada em um cenário considerando as quatro populações. A análise revelou que a maior parte da variação genética foi decorrente da variação entre as

populações (55,12%), enquanto a variação dentro das populações mostrou-se baixa (44,87%), conforme tabela 16.

Tabela 13: Resultado da análise molecular de variância (AMOVA) para os dados de cpDNA, excluindo-se a população da *Vriesea Saundersii*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados dos desvios	Componentes de variação	(%) variação	Índice (Φ)	<i>p</i> - valor
1 Grupo: (VB_IT, VB_CHA, VB_PA) - (VS_PB)					
Entre populações	770.199	35.40	55.12	$\Phi_{ST} = 0.55$	0.00 +- 0.00
Dentro das Populações	806.833	28.81	44.87		
Total	1577.032	64.21			

Para estimar a contribuição do fluxo de pólen versus semente foram utilizados os valores de F_{STc} (0.55) e de F_{STn} (0.75) obtidos com base na AMOVA excluindo-se *V. saundersii*, na qual pôde ser constatado uma eficiência ligeiramente maior ($r = 1.35$) do fluxo de pólen em relação ao fluxo de sementes. Embora o valor encontrado tenha sido bastante reduzido, condizente com os elevados valores de estruturação observados por este estudo.

Tanto o valor de G_{ST} ($p = 0.72 \pm 0.10$), quanto o valor de N_{ST} ($p = 0.80 \pm 0.14$) foram elevados e significativos, indicando um alto nível de estruturação genética entre as populações, em conformidade com as demais análises moleculares realizadas por este estudo.

5. DISCUSSÃO

Espécies que apresentam populações com número reduzido de indivíduos, de ocorrência em ambientes fragmentados, com forte influência da ação antrópica, merecem elevada atenção por apresentarem riscos iminentes de extinção, uma vez que, sob tais condições, eventos genéticos como deriva gênica e endocruzamento podem se tornar mais extremos (Franklin *et al.* 2008). A espécie *V. botafogensis* é uma espécie com reduzido número de representantes, composta por três populações que distam no máximo cerca de 30 km entre elas, além do fato de serem endêmicas de *inselbergs* em um bioma em constante antropização e fragmentação. Sendo assim, é possível que essa espécie apresente baixos índices de diversidade genética, alta estruturação populacional e altos coeficientes de endocruzamento, devido a forte influência da deriva gênica e do endocruzamento, e ao limitado fluxo gênico entre as suas populações.

As populações VB_PA e VB_CHA foram as que apresentaram os menores índices de diversidade genética. A primeira população localiza-se no Monumento Natural do Pão de Açúcar, que tem sido alvo de incêndios e tragédias ambientais provocadas por balões e também por usuários que têm removido a vegetação das encostas, conforme dados não oficiais disponibilizados em sites de alpinistas (Teixeira, 2011). Enquanto que a população VB_CHA, localizada no Parque Estadual da Chacrinha, é cercada pela ocupação humana mais densa do RJ, conforme dados contidos no Plano de Manejo Diretor do Parque, (2006), o que a torna mais susceptível aos impactos ambientais decorrentes de um crescimento desordenado, poluição etc.

As populações VB_IT e VS_PG foram as que apresentaram os maiores índices de diversidade genética. A primeira localiza-se no Parque Estadual da Serra da Tiririca

abrangendo uma área extensa de 4500 ha (INEA, 2015), que embora tenha sofrido com impactos ambientais, iniciados no período colonial, ainda manteve boa parte do seu patrimônio genético conservado e representativo da flora de todo o Estado.. A Pedra Bonita/Pedra da Gávea está contida no Parque Nacional da Tijuca (ICMBIO, 2015) e, embora o acesso às trilhas se faça por diferentes locais, existe uma série de obstáculos ao acesso humano, como as condições do terreno, em constantes erosões; um baixo número de orientações somado a um percurso longo de 2500 m (CPRM, 2015). Essas dificuldades no acesso podem ter contribuído para a manutenção da integridade dessa unidade de conservação.

Com base em uma análise descritiva dos oito locos microssatélites do DNA nuclear foi possível inferir que as populações VS_PG e VB_IT apresentaram o maior número médio de alelos, a maior quantidade de alelos exclusivos, a maior riqueza alélica, os maiores índices de heteroziguidade, valores negativos do índice de endocruzamento (f) e a maior distância genética/geográfica entre elas. Enquanto que as populações VB_CHA e VB_PA apresentaram o menor número médio de alelos, a menor quantidade de alelos exclusivos, os menores índices de riqueza alélica, os menores valores de heteroziguidade, valores positivos de endocruzamento e um maior grau de aproximação genética, condizente com a menor distância geográfica existente entre elas.

Segundo Cornuet e Lulart (1996) e Piry *et al.* (1999), populações que experimentaram recentes reduções de tamanho populacional acompanham consigo reduções no número de alelos e dos níveis de heteroziguidade (Sanchez *et al.* 2008). É possível aplicar essa hipótese às populações VB_CHA e VB_PA, uma vez que foi observado valores reduzidos de H_0 e H_E , condizentes com um baixo número total de alelos que as mesmas apresentam para todos os locos analisados.

Em um levantamento com base na literatura, a partir de estudos que fizeram uso de marcadores microssatélites nucleares foram obtidos dados provenientes de espécies pertencentes a diferentes gêneros: *Alcantera*, *Pitcarnia* e *Vriesea*, cujos valores de heterozigosidade apresentaram-se, em sua maior parte, reduzidos à moderados. Estudos realizados por Barbará *et al.* (2007, 2009) resultaram em valores moderados de heterozigosidade para as espécies *Alcantera geniculata* ($H_O = 0.356$; $H_E = 0.380$), *Alcanterea glaziouna* ($H_O = 0.259$; $H_E = 0.334$), *Alcanterea imperialis* ($H_O = 0.357$; $H_E = 0.398$), com excessão da espécie *Alcanterea regina* que apresentou valores mais elevados ($H_O = 0.458$; $H_E = 0.523$). Os estudos de diversidade genética realizados por Palma-Silva *et al.* (2009, 2011) também identificaram valores moderados para as espécies *Pitcairnia albiflos* ($H_O = 0.383$; $H_E = 0.429$), *Pitcairnia staminea* ($H_O = 0.347$; $H_E = 0.452$), com exceção da espécie *Vriesea gigantea* que apresentou valores mais elevados ($H_O = 0.431$; $H_E = 0.579$). Boisselier-Dubayle *et al.* (2010) também dedicou-se a estudar o gênero *Pitcairnia*, tendo *Pitcairnia geyskesii* como sua espécie em estudo, cujos valores obtidos também foram moderados ($H_O = 0.293$; $H_E = 0.325$). Dessa forma, é possível observar valores intermediários de H_O na maior parte dos estudos realizados para a família Bromeliaceae, condizente com os valores encontrados por este estudo.

Também foi realizado um levantamento de espécies que tiveram seus índices de heterozigosidade calculados, mas com base em marcadores de aloenzimas, que apareciam com frequência em estudos de diversidade até o surgimento dos marcadores microssatélites, que desde então têm sido amplamente utilizados (Goetze *et al.* 2010). Foram obtidos dados de diversidade genética de diferentes gêneros da família Bromeliaceae, dentre eles: *Aechmea*, *Dyckia*, *Pitcairnia*, *Tillandsia* e *Vriesea*. Um estudo realizado por Murawski e Hamrick (1990) revelou valores reduzidos de heterozigosidade

para a espécie *Aechmea magdalenae* ($H_O = 0.099$ e $H_E = 0.084$). Izquierdo e Piñero, (2000) também estudaram o gênero *Aechmea*, mas tiveram como espécie-alvo: *Aechmea tuitensis*, cujo os valores obtidos também foram reduzidos ($H_O = 0.061$ e $H_E = 0.12$). Hmelyevsky *et al.* (2010) estudou a espécie *Dychia ibiramensis* e obteve valores reduzidos ($H_O = 0.055$ e $H_E = 0.098$). González-Astarga *et al.* (2004) e Soltés *et al.* (1987) estudaram duas espécies do mesmo gênero, *Tillandsia achyrostachys* ($H_O = 0.127$ e $H_E = 0.210$) e *Tillandsia ionantha* ($H_O = 0.056$ e $H_E = 0.043$), respectivamente, e para ambas, os valores foram reduzidos. Alves *et al.* (2004) estudou a espécie *Vriesea friburgensis* que apresentou valores reduzidos ($H_O = 0.234$ e $H_E = 0.226$), de acordo com as demais espécies.

Conforme pôde ser observado neste levantamento, os valores de heterozigidade, com base em marcadores de aloenzimas, são bem reduzidos em comparação aos obtidos por meio de marcadores microssatélites. Essa constatação é reforçada comparando-se dois estudos, cuja finalidade era estudar a diversidade genética da espécie *Pitcairnia geyskessi*, realizados por Sarthou *et al.* (2001) e por Boisselier *et al.* (2010), nas quais distinguem-se pelo tipo de marcador molecular empregado. O estudo de Sarthou *et al.* (2001) fez uso de marcadores de aloenzimas, o que resultou em valores reduzidos de heterozigidade ($H_O = 0.185$ e $H_E = 0.183$), enquanto que o estudo desenvolvido por Boisselier *et al.* (2010) fez uso de marcadores microssatélites e obteve valores moderados de heterozigidade ($H_O = 0.293$ e $H_E = 0.325$). Dessa forma, torna-se difícil realizar comparações de parâmetros de diversidade entre esses marcadores, uma vez que marcadores microssatélites, além de apresentarem valores moderados de heterozigidade, têm gerado alto polimorfismo nas espécies às quais são empregados (Zanella *et al.* 2012).

Os valores de riqueza alélica são fortemente influenciados pelo número de alelos exclusivos pertencentes à cada população (Melo *et al.*, 2012). Indivíduos que portam alelos

exclusivos podem atuar como fonte de variabilidade, uma vez que a partir do conhecimento da riqueza alélica é possível formular estratégias visando a introdução desses alelos em outras populações, que carecem de diversidade genética. Dessa forma, populações com alta riqueza alélica tornam-se importantes na manutenção dos níveis de heterozigosidade, disseminando os seus alelos exclusivos para outras populações (Melo *et al.*, 2012). O aumento dos níveis de riqueza alélica junto aos níveis de heterozigosidade pode ser observado nas populações deste estudo, nas quais VB_IT e VS_PB apresentaram os maiores valores de H_E e R_S , em contraste com as populações VB_CHA e VB_PA.

Os valores de riqueza alélica também são bastante informativos no que tange história demográfica das populações, uma vez que a partir deles é possível inferir se as populações passaram por algum evento de *boottleneck* (gargalo genético) (Melo *et al.*, 2012). Além disso, há o efeito de deriva genética fortemente associado, que pode ocorrer em populações que carregam uma pequena porção de variação genética de uma população maior, ou seja, que foram constituídas por poucos migrantes ou fundadores (Sanchez *et al.* 2008). Dessa forma, os valores obtidos por este estudo sugerem que as populações VB_CHA e VB_PA, possam ter sido fundadas por um número reduzido de indivíduos que carregavam uma baixa variação genética, o que pode ter acarretado em um empobrecimento no *pool* genético dessas populações. .

Segundo Fisher *et al.* (2000), espécies alógamas tendem a apresentar altos índices de variabilidade genética e baixa diferenciação entre as populações. Entretanto, as populações de *V. botafogensis* estudadas apresentaram características opostas a estas, com baixos/médios índices de diversidade e elevada estruturação populacional ($F_{st_n} = 0.75$ $F_{st_c} = 0.55$). As populações estudadas são dotadas de características especiais que as fazem não se enquadrar necessariamente nessa hipótese. Em geral elas apresentam um número

reduzido de indivíduos, em um isolamento natural sob o modelo biogeográfico de ilhas, imposto pelos *inselbergs* às quais são endêmicas.

De acordo com a literatura, espécies autogâmicas e/ou que realizam fecundação mista, geralmente apresentam maiores valores de F_{IS} , em comparação com espécies que realizam fecundação cruzada (Zanella *et al.*, 2012) Essa constatação pode ser observada nas espécies *Piticaria staminea* ($F_{IS} = 0.240$), *Dyckia ibiramensis* ($F_{IS} = 0.436$) e *Vriesea gigantea* ($F_{IS} = 0.273$), sendo a primeira autogâmica e as demais dotadas de sistema misto de cruzamento. Em contrapartida, espécies que realizam fecundação cruzada têm apresentado valores reduzidos à moderados de F_{IS} como as espécies *Alcantarea geniculata* ($F_{IS} = 0.094$), *A. geaziouana* ($F_{IS} = 0.156$) e *A. regina* ($F_{IS} = - 0.051$) (Barbará *et al.* 2007, 2009),. As espécies *Pitcairnia albiflos* ($F_{IS} = 0.109$), estudada por Palma-Silva *et al* (2010) e *Achmea winkleri* ($F_{IS} = 0.152$), estudada por Goetze *et al.* (2010), ambas dotadas de sistema de fecundação cruzada, apresentaram valores reduzidos, condizentes com os valores gerados para *V. botafogensis* e *V. saundersii* neste estudo.

Como se sabe, tanto a endogamia quanto o cruzamento entre parentes próximos podem resultar em desvios neste modelo que pressupõe que os cruzamentos entre os indivíduos ocorram ao acaso (Flanklin *et al.* 2008). Os valores médios de f nas populações VB_CHA e VB_PA foram positivos e moderados ($f = 0.08$ e 0.14 , respectivamente), indicando um possível processo de endogamia, que é reforçado pelos desvios no EqHW para excesso de homozigotos, encontrados nessas duas populações. Sendo assim, esses valores sugerem a ocorrência de endocruzamento ou a presença de alelos nulos nessas duas populações. Entretanto, as populações VB_IT e VS_PB apresentaram valores médios à negativos do coeficiente de endocruzamento (f) ($f = - 0.22$ e $- 0.01$, respectivamente), indicando um possível processo de exogamia, que além de ser coerente com a maior

quantidade de heterozigotos e com os índices de diversidade genética do presente estudo, também é reforçado pelos desvios no EqHW para excesso de heterozigotos, apresentados nessas duas populações.

Em relação às distâncias genética, observou-se que os maiores valores ocorrem entre as populações VB_IT e VS_PB. Além de serem populações pertencentes à espécies diferentes, acrescenta-se o fato de estarem à 26 Km de distância uma da outra, sendo, dentre as populações estudadas, às que mais se distanciam geograficamente. As populações VB_PA e VB_CHA, em contraste, foram as que apresentaram a menor distância genética, em conformidade com o alto número de alelos compartilhados entre elas, e com a reduzida distância geográfica, de cerca de 1 Km somente. Dessa forma, esses dados são sugestivos de um maior fluxo gênico entre essas duas populações, e menor entre elas com a população de VB_IT.

A árvore filogenética obtida (figura 06) revelou uma maior proximidade genética das populações VB_PA e VB_CHA com a população VS_PB, e não com a população VB_IT, conforme esperado por se tratarem da mesma espécie. Esse resultado inesperado pode ter sido fortemente influenciado pela inexistência de dados de genotipagem para quatro locos microssatélites na análise da população VB_IT conforme descrito na sessão “Resultados”. Essa ausência de dados para quatros locos microssatélites para a população VB_IT pode ter contribuído para distanciar ainda mais essa população das outras duas, embora as três pertençam a mesma espécie, uma vez que esses quatro locos continham informações que aproximavam mais essa população das outras duas de *V. botafogensis*. Em contrapartida, a população VS_PB se tornou mais próxima das outras duas populações de *V. botafogensis*, embora pertença a uma outra espécie.

Segundo Wrigh *et al.* (1943) quanto maior é a distância entre as populações mais restrito torna-se o fluxo de pólen e/ou semente, acarretando em um isolamento das unidades amostrais e aumento da divergência genética por deriva gênica ou seleção natural (Sebbenn *et al.* 2010). Essa constatação é reforçada pelo limites alcançáveis do pólen e semente, sendo o primeiro raramente transportado à distâncias maiores que 1.000 m, e o último, geralmente distribuído em torno da árvore-mãe, com um alcance que, raramente chega a distâncias maiores de 200 m (Martins *et al.* 2005). Foi verificado com base no teste de Mantel um valor alto e significativo de correlação entre distância geográfica e genética das populações avaliadas por este estudo, sugerindo um padrão de isolamento por distância. Com base nisso é possível constatar as dificuldades que as populações encontram no estabelecimento de trocas gênicas entre elas, uma vez que além de distanciarem consideravelmente uma das outras, ainda encontram barreiras físicas que dificultam o fluxo gênico entre elas.

Neste estudo também foram empregadas regiões intergênicas do DNA cloroplastidial (cpDNA), uma vez que essa ferramenta têm se mostrado bastante capaz de elucidar questões sobre a filogeografia das espécies (Goetze *et al.* 2010). O seu emprego em estudos de genética da conservação tem se tornado cada vez mais constante, principalmente pelo fato do seu genoma ser extremamente conservado, uma vez que não sofre recombinação, e apresenta baixas taxas de mutação (Mello *et al.* 2012). Entretanto, Segundo Maia *et al.* (2012), é amplamente reconhecido que pouca ou nenhuma variação tem sido encontrada utilizando o genoma do cloroplasto em espécies de Bromeliaceae, embora existam poucos trabalhos de diversidade plastidial desenvolvidos para esta família (Capra *et al.* 2012). Apesar disso, o valor de diversidade haplotípica observado no presente estudo foi alto, com a presença de haplótipos exclusivos para algumas populações, o que

contrastou com a diversidade nucleotídica, que apresentou valores bastante reduzidos, decorrentes da pouca diferença existente entre os haplótipos.

Com base no número de haplótipos obtidos é possível observar que a população VB_CHA foi a única que não apresentou variação genética, tendo sua única sequência compartilhada com a população VB_PA, reforçando os resultados obtidos com base nos marcadores nSSR, que indicam uma aproximação entre essas duas populações. A população VB_PA apresentou mais variação, contendo três haplótipos, incluindo o H5, que separa por dois passos mutacionais às populações de *V. botafogensis* da população de *V. saundersii*. A população de VB_IT também apresentou uma certa variação, contendo 3 haplótipos, formando um clado bem definido separado das população de VB_CHA e VB_PA por três passos mutacionais, o que vai ao encontro dos resultados obtidos para as demais análises, que indicam uma forte estruturação por parte desta população. A única população pertencente a a espécie desde estudo (VS_PG) apresentou menor variação em relação à VB_IT, mas também formou um clado bem definido, com suas duas sequências distanciando-se da população de VB_PA por dois passos mutacionais, coerente com as outras análises, que indicam um certo distanciamento desta população com as demais, o que condiz com o fato de tratarem-se de espécies diferentes.

Análises genéticas com base nos valores de F_{STc} também foram realizadas neste estudo, fazendo uso de marcadores de cpDNA. Dessa forma, os valores de F_{STc} obtidos com base nesse genoma foram maiores do que com base em marcadores nSSR, como já era previsto, uma vez que o fluxo gênico para este tende a ser menor do que o nuclear, devido a herança uniparental que o cpDNA carrega (Néri *et al.* 2011). Além disso, o valor de G_{ST} obtido por esse marcador foi consideravelmente maior do que o valor médio de F_{ST} gerado pelas análises nucleares, reforçando essa idéia.

Segundo Degen *et al.* (2001), a estruturação genética de uma população está fortemente relacionada com a dispersão de suas sementes, sendo assim, populações com dispersão restrita tendem a apresentar alta estruturação, enquanto às que apresentam ampla dispersão, tendem a apresentar baixos índices de estruturação. Sendo assim, os valores de F_{STc} em uma comparação par a par entre as populações, reforçou os resultados obtidos com base em marcadores nucleares, na qual as populações VB_CHA e VB_PA apresentaram os menores valores de estruturação, o que nos permite relacionar a uma provável dispersão gênica acentuada entre essas populações, enquanto que as demais comparações apresentaram elevados índices de estruturação, indicando dispersão restrita entre elas.

Foi realizada uma análise molecular de variância na qual foi constatado maior variação genética entre as populações, com uma porcentagem bastante superior a variação oriunda entre os indivíduos das populações. Esse resultado foi concordante com a AMOVA realizada com base em marcadores microssatélites nucleares, que também apresentou maior variação entre as populações, entretanto, a porcentagem não se deu em valores tão superiores quanto quando a avaliação foi feita com base no cpDNA. Esse resultado reforça os outros obtidos por este estudo, que constata o elevado nível de estruturação das populações estudadas.

Em relação a estrutura filogeográfica, o valor de G_{ST} obtido foi menor do que o valor de N_{ST} , o que indica a presença de estrutura filogeográfica. Segundo Pons e Petit (1996) e Burban *et al.* (1999), quando os valores de G_{ST} são menores do que os valores de N_{ST} , os haplótipos mais fortemente relacionados tendem a se distribuir de acordo com a filogenia às quais pertencem. O isolamento físico imposto pela Baía de Guanabara entre a população VB_IT, à leste, e as populações VB_CHA, VB_PA e VS_PG, à oeste, pode ocasionar, com o decorrer do tempo um isolamento reprodutivo, podendo vir a disparar um

processo de especiação alopátrica. Sendo assim, é indispensável que se dê a real importância a situação iminente de perda de conectividade entre membros de uma espécie e que seja estabelecido esforços conservacionistas, desde o incentivo à estudos de caracterização genética à medidas práticas de manejo.

A espécie *V. botafogensis* é endêmica de afloramentos rochosos, vivendo sob uma matriz fragmentada, em um contínuo processo de antropização. Suas três populações são compostas por um número bastante reduzido de indivíduos, apresentando considerável distância geográfica entre elas, somado ao fato de serem alvos de extrativismo para fins ornamentais. Pôde ser observado neste estudo, que o fluxo gênico é restrito, principalmente entre as população de Itacoatiara e as demais populações, que concentram-se à oeste da Baía de Guanabara. Essa distância se torna bastante pronunciada quando analisamos os resultados de estruturação genética, que indicam que os maiores índices de diversidade estão contidos na população de Niterói, em comparação as outras duas. Sendo assim, é possível elaborar uma medida conservacionista, na qual separe a população de Itacoatiara das populações da Chacrinha e Pão de Açúcar, propondo que essas duas últimas sejam tratadas como uma única unidade evolutiva significativa. Essa distinção no tratamento seria uma forma de maximizar a retenção da diversidade genética encontrada na população de Itacoatiara e promover esforços para aumentar a diversidade genética das outras duas populações, que se mostraram bastante reduzida.

Com base nos valores de diversidade genética obtidos nas análises da população de *Vriesea saundersii*, é possível propor uma medida de manejo, nos mesmos moldes que a proposta à população de Itacoatiara. Tendo em vista a retenção da alta diversidade genética encontrada nessa população, o ideal seria considerá-la como uma unidade evolutiva

significativa, assim como as populações de Chacrinha e Pão de Açúcar, consideradas em conjunto e a população de Itacoatiara, considerada isoladamente.

6. CONCLUSÕES

1. As populações VB_IT e VS_PB foram as que apresentaram maior variabilidade genética, coerente com o grau de preservação destas áreas e com as dificuldades do acesso humano as unidades de conservação às quais estão localizadas, em contraste com VB_PA e VB_CHA, na qual o acesso se dá de forma mais intensificada.
2. As populações VB_IT e VS_PB foram as que apresentaram maior diferenciação genética em relação as demais populações, em contraste com as populações VB_CHA e VB_PA, sugerindo constantes trocas gênicas entre essas duas últimas populações.
3. Nas análises com base no genoma nuclear, às populações VB_CHA e VB_PA aparecem mais relacionadas geneticamente com a população VS_PB, mesmo tratando-se de uma outra espécie. Entretanto, houve inexistência de dados na genotipagem de VB_IT, o que pode ter distanciando a mesma das demais populações.
4. As espécies *V. botafogensis* e *V. saundersii* apresentam estrutura filogeográfica, contendo haplótipos singulares e com uma baixa diferenciação entre eles.
5. O fato das populações estarem localizadas em *inselbergs* limita o fluxo gênico entre elas, aumentando o grau de estruturação gênica entre as mesmas.

6. A Baía de Guanabara pode ser considerada uma barreira natural às trocas gênicas entre as populações, uma vez que VB_IT, ao leste da baía, apresentou-se mais distante geneticamente das outras duas populações de *V. botafogensis*.

7. Em relação a medidas conservacionistas, nossos resultados indicam que a população VB_IT deve ser tratada como uma unidade evolutiva independente das demais populações. Enquanto que VB_CHA e VB_PA podem ser tratadas em conjunto.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. Journal Compilation©. Blackwell Publishing Ltd: **Molecular Ecology**, Córdoba, p. 5177-5188, 24 set. 2008.

ALVES, GM. et al. Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic Forest. **Plant Genet Resour** 2:23-28, 2004.

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). **Mol Ecol** 16:1981-1992, 2007.

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). **Ann Bot** 103:65-77, 2009.

BARBOSA, MR. **Estudos Florísticos e Fitossociológicos da Mata do Buranquinho, Remanescente da Mata Atlântica em João Pessoa, PB**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 1996.

BOISSELIER-DUBAYLE. MC. et al. C. 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.

BRASIL. Constituição (2008). Decreto nº 6.600, de 21 de novembro de 2008. Regulamenta Dispositivos da Lei no 11.428, de 22 de Dezembro de 2006, Que Dispõe Sobre A Utilização e Proteção da Vegetação Nativa do Bioma Mata Atlântica. Brasília, DF, 21 nov. 2008.

BROWN, TA. **Clonagem Gênica e análise de DNA (uma introdução)**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2003. 376 p.

BURBAN, C. et al. Range wide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. **Mol. Ecol.**, v. 8, p. 1.593-1.602, 1999.

BUSO, GSC et al. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais: Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p.46-50, jan./jun. 2003.

CÂMARA, IG. The Atlantic forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook. Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte : **Conservação Internacional**, 472 p, 2005

CAPRA, F. **Diversidade e estruturação genética em populações de *Archmea Kertesziae* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica de Santa Catarina.** 2012. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

COFFANI-NUNES, JV et al. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais.** São Paulo: Editora Senac, 2002. 215 p.

CORNUET, J. M.& LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, 144 (4): 2001 – 2014, 1996.

CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND (Brasil). **Perfil do ecossistema: Mata Atlântica Hotspot de Biodiversidade.** Belo Horizonte: Conservation International do Brasil, 2001.

DEGEN, B et al. Spatial Genetic Software : a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structure of individuals and populations. **Journal of Heredity**, 92 (5): 447-449, 2001.

FALEIRO, FG. **Marcadores Genético-Moleculares: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, Df: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Cerrados, 120 p, 2007

FISCHER, M. et al. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **Am J Bot** 87: 1128-1137, 2000.

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

FUNDAÇÃO INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS: **Plano de Manejo Diretor do Parque Estadual da Chacrinha**. Rio de Janeiro, 2006.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica no período de 2011-2012**. São Paulo: Arcplan, 61 p, 2013.

GIVNISH, T. et al. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal Of Botany**, Florida, v. 98, n. 5, p.872-895, 09 fev. 2011.

GIVNISH, TJ. et al. Adaptive radioation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. Florida: **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 11 out. 2013.

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.

GOMES, CC; MOURA, TM. **Estrutura Genética em populações de plantas do Cerrado**. 18 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

HMELJEVSKI KV et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from southern Brazil. **Conserv Genet** 12:761-769, 2011.

HMELJEVSKI, KV. **Caracterização reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz, uma bromélia endêmica do Alto Vale do Itajaí, SC**. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

HOFFMANN, LV; BARROSO, PAV. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas**. Campina Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, 35 p, 2006.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE: **Parque Nacional da Tijuca**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/o-que->

fazemos/visitacao/unidades-abertas-a-visitacao/210-parque-nacional-da-tijuca.html>

Acesso em: 14 fev. 2015.

INSTITUTO DE ESTUDOS SOCIOAMBIENTAIS DO SUL DA BAHIA (IESB) (Brasil). Projeto de Conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira: **Levantamento da Cobertura Vegetal Nativa do Bioma Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Edital Probio 03/2004, 84 p. 2007.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE: **Parque Estadual da Serra da Tiririca**.

Disponível em:

<http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/BIODIVERSIDADEEAREASPROTEGIDAS/UnidadesdeConservacao/INEA_008600> Acesso em: 14 fev. 2015.

IZQUIERDO, LY and PIÑERO, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). **Aust J Bot** 48:645-650, 2000.

KLUGE, M; BUDEL, B. Inselbergs: Vegetation, diversity and ecology. Unesco - Encyclopedia Of Life Support Systems (eolss): **Tropical Biology and Conservation Management**, New York, v. 4, p.1-10, 2013.

KUNZ, E. F. The refugee in Flight: Kinetic Models and Forms os Displacement. *International Migration Review*. JSTOR, New York, v. 7, n. 02, p. 125-146, Set. 2007.

LEME, EMC; COSTA, A. *Vriesea saundersii* e *V. botafogensis*, duas espécies distintas. Rio de Janeiro: **Herbarium Bradeanum**, p.11-18, 1994.

MARTINELLI, G. et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. Rio de Janeiro: **Rodriguésia**, v. 1, n. 59, p.209-258, fev. 2008.

MARTINELLI, G; MORAES, MA. Livro Vermelho da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: **Centro Nacional de Conservação da Flora**, 2013

MARTINS, K. **Diversidade Genética e fluxo gênico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* ST.HIL. (SOLANACEAE) no sudeste de Goiás.** 2005. 141 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MEDEIROS, CFL et al. Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação. Rio de Janeiro: **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 2, p.25-36, 20 out. 2006.

MEDINA, I.M. Serviço Geológico do Brasil: **Excursão virtual à Pedra da Gávea.**

Disponível em:

<http://www.cprm.gov.br/geoecoturismo/pedra_gavea/excursoavirtual.html> Acesso

em: 14 fev. 2015.

MELO, ATO. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Caralea canjerana* (Vell) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica.** 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MITTERMEIER, R.A et al. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Cons. Biol.** 12, 516± 520, 1998.

MÖLLER, M; PINHEIRO, JB. Comparações e novas abordagens no desenvolvimento de marcadores microssatélites. In: SEMINÁRIOS EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, Piracicaba: Usp, 2014. p. 1 – 2, 2014.

MURAWSKI, DA and HAMRICK JL. Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. **Am J Bot** 77:1201-1208, 1990.

MYERS, N et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Washington: **Nature** 403: 853-858, 2000.

NÉRI, J. **Análise dos padrões filogeográficos de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Calophyllaceae).** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

NOGUEIRA, LC; FILIPE, CHO. Mata Atlântica: Origem do bioma, caracterização e áreas de ocorrência. Juiz de Fora: **Arte e Ciência**, 09 set. 2008.

PALMA-SILVA, C et al. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. Fribourg: **Heredity**, n. 103, p.513-508, 09 set. 2009.

PALMA-SILVA, C et al. Meiotic behavior and pollen viability of wild populations of the neotropical species *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). **Plant Spec Biol** 23:217-221, 2008.

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

PEREIRA, FRL; QUIRINO, ZGM. Fenologia e biologia floral de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) na Caatinga Paraibana. João Pessoa: **Rodriguésia**. v. 4, n. 59, p.835-844, 2008.

PEREIRA, PN et al. Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). São Paulo: **Journal Of Plant Physiology**, v. 170, n. 12, p.1067-1074, 15 ago. 2013.

PIRY, S et al. A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **J. Hered.** 90: 502-503. 1999.

PONS, O. & PETIT, R J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered and unordered alleles. *Genetics*, 144: 1237–1245, 1996.

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

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

QUEZADA, IV; GIANOLI, E. Crassulacean acid metabolism photosynthesis in Bromeliaceae: an evolutionary key innovation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 104, n. 2, p.480–486, may. 2011

RIBEIRO, RA; RODRIGUES, FM. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. Salvador: **R. Ci. Méd. Biol**, v. 5, n. 5, p.253-260, dez. 2006.

SÁNCHEZ, CFB. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética**. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

SANTOS, AMM et al. Biogeographical relationships among tropical forests in North-Eastern Brazil. **Journal of Biogeography** 34: 437– 446, 2007.

- SARTHOU, C . et al. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. **Am J Bot** 88:861-868, 2001.
- SCARANO, FR. Plant communities at the periphery of the Atlantic rain forest: Rare-species bias and its risks for conservation. Rio de Janeiro: **Biological Conservation**, n. 142, p.1201-1208, mar. 2009.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** 18: 233–234, 2000.
- 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* london: **Desf. Heredity**, v. 106, p. 134-145, 2011.
- SOLTIS, DE et al. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionatha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). **Am J Bot** 74:531-537, 1987.
- STEHMANN, JR et al. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 516 p., 2009.
- TEIXEIRA, D.S. Nove anos de reflorestamento do Pão de Açúcar. Disponível em: <<http://paodeacucarverde.blogspot.com.br/2011/07/nove-anos-de-reflorestamento-no-pao-de.html>> Acesso em: 14 fev. 2015.

TONHASCA, J. Athayde. *Ecologia e História Natural da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro: **Interciência**, 197 p., 2005.

TOWNSEND, CR et al. **Fundamentos em ecologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.a., 576 p., 2010.

TURCHETTO-ZOLET, AC et al. **Guia Prático para estudos Filogeográficos**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 105 p., 2013.

VARUZZA, L. **Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração** Versão 2.0.1. 2. ed. São Paulo: Life Technologies, 2013. 76 p.

VERÇOZA, Fábio C; BASTOS, Marcello S. Bromeliaceae e Cactaceae dos afloramentos rochosos do Costão de Itacoatiara, Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Esfa: Natureza on line*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p.7-11, 15 jan. 2013.

VIADANA, AG; CAVALCANTI, APB. A teoria dos refúgios florestais aplicada ao estado de São Paulo. Teresina: **Revista da Casa da Geografia de Sobral**, v. 8/9, n. 1, p.61-80, 2007

VIJAYAN, K; TSOU, C.M. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. **Current Science**, v. 99, n. 11, p. 1.530-1.541, 2010.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.

ZANELLA, CM et al. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). **Am J Bot** 98:1511-1519, 2011.

ZANELLA, CM et al. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. Porto Alegre: **Genetics And Molecular Biology**, v. 4, n. 35, p.1020-1026, 2012.

ZAROS, LG; SILVA, NA; NINOV, K. Sequenciamento - Kit AMERSHAM (GE). 2008. 8 p.