



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudos moleculares populacionais com o complexo específico
***Encholirium spectabile* Mart. ex Schult. f. em ‘inselbergs’ do**
Nordeste Brasileiro

Aluno: Rodrigo César Gonçalves de Oliveira
Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon
Co-orientador: Prof. Dr. Marccus Vinicius Alves

Recife, Fevereiro/2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Estudos moleculares populacionais com o complexo específico
Encholirium spectabile Mart. ex Schult. f. em ‘inselbergs’ do
Nordeste Brasileiro.**

O trabalho aqui apresentado visa
à aquisição de título de Mestre em
Ciências Biológicas.

Aluno: Rodrigo César Gonçalves de Oliveira

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon

Co-orientador: Prof. Dr. Marccus Vinicius Alves

Recife, Fevereiro/2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Rodrigo César Gonçalves de

Estudos moleculares populacionais com o complexo específico *Encholirium spetctabile* Mart. Ex Shult. F. em “inselbergs” do Nordeste brasileiro / Rodrigo César Gonçalves de Oliveira. – Recife: O Autor, 2012.

106 f.: il.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon, Marccus Vinicius Alves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui referências e anexos

1. Bromeliácea 2. Bromélias 3. Filogenia I. Issepon, Ana Maria Benko (orient.)
II. Alves, Marccus Vinicius III. Título.

584.85

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-291

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

Rodrigo César Gonçalves de Oliveira

Estudos moleculares populacionais com o complexo específico
Encholirium spectabile Mart ex. Schult. f. em ‘inselbergs’ do
Nordeste Brasileiro

Dissertação apresentada à Coordenação do curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas – Mestrado, da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção
do grau de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon

Co-Orientador: Prof. Dr. Marccus Vinicius Alves

Data de Aprovação 27/02/2012

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. ANA MARIA BENKO ISEPPON - (Orientadora)
Pós-graduação em Ciências Biológicas - UFPE

Dr^a. VALESCA PANDOLFI - (Titular interno)
Pós-graduação em Ciências Biológicas - UFPE

Dr^a. CLARISSE PALMA DA SILVA - (Titular externo)
Instituto de Botânica de São Paulo – IBT/SP

Prof^a. Dr^a. MARIA TERESA DOS SANTOS CORREIA - (Suplente interno)
Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE

Prof^a. Dr^a. MARIA DAS GRAÇAS LAPA WANDERLEY - (Suplente externo)
Instituto de Botânica de São Paulo – IBT/SP

A Vida do viajante (Luiz Gonzaga)

Minha vida é andar
Por esse país
Pra ver se um dia
Descanso feliz
Guardando as recordações
Das terras por onde passei
Andando pelos sertões
E dos amigos que lá deixei

Chuva e sol
Poeira e carvão
Longe de casa
Sigo o roteiro
Mais uma estação
E a saudade no coração

Mar e terra
Inverno e verão
Mostra o sorriso
Mostra a alegria
Mas eu mesmo não
E a alegria no coração

*À Chiara Lubich (in memoriam) mulher que
tornou o caminho mais agradável para mim e para o mundo
me fazendo um ser humano completo e mais justo*

Dedico.

*... mas o mundo não a conheceu
... mas os seus não a receberam.*

Agradecimentos

A **Deus** por tanto amor e pela vida.

Aos meus familiares, em especial meus pais **Isac José de Oliveira** e **Cléia Lúcia Gonçalves de Oliveira**, meu irmão **Rafael Victor Gonçalves de Oliveira** à minha tia **Cícera Virgínia Gonçalves da Silva** e à minha avó **Francisca Gonçalves da Silva** e avô **Manuel Justino da Silva** pelo apoio na educação e por terem acreditado no meu potencial.

Ao **Bruno Gomes Brilhante** pelo companheirismo e por ter sido um porto seguro nos momentos de estresse, os quais foram cruciais para o meu bem estar e desenvolvimento desse trabalho.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a Dr^a **Ana Maria Benko Iseppon** pela amizade, paciência e oportunidade de trabalho.

À amiga e Prof^a Dr^a **Maria das Graças Lapa Wanderley** pela presença nos trabalhos, conhecimento taxonômico compartilhado, auxílio nas coletas e estágios realizados nesse período.

Aos pesquisadores Dr^a **Clarisse Palma da Silva** e Dr. **Fábio Pinheiro** pela amizade e oportunidade de estágio.

À Prof^a Dr^a **Ana Christina Brasileiro Vidal** pelo apoio e pela ajuda nos momentos de dificuldade durante a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Marccus Vinicius Alves** pelos conselhos, incentivo e ajuda no tratamento taxonômico, além do auxílio em coletas.

Às professoras Dr^a **Ana Paula Prata**, Dr^a **Rosângela Simão Bianchini**, Dr^a **Kyria Bortoleti**, aos amigos **Daniel Melo**, **Marcelo Sobral** e **Mateus** pelo auxílio e companheirismo nas coletas.

Ao meu *brother* **Fábio da Silva do Espírito Santo** por toda ajuda nas coletas, as quais foram essenciais para que o presente trabalho fosse efetuado.

Aos amigos de colega de trabalho Msc. **Diego Sotero**, Msc. **Geyner Cruz**, Msc. **Anderson Santos**, Msc. **Santelmo Vasconcelos** e Msc. **Rafael Louzada** pela ajuda nas correções dos textos, no laboratório e incentivos de sucesso.

Às técnicas do LGBV **Vanessa Souza**, **Valéria** e **Andréia** pelos “puxões de orelha” e por não terem deixado nada faltar para a realização dos experimentos. A **Tia Zizi** e **Romildo** pela

solicitude. Também ao amigo e técnico **Rodrigo Pegorim** pelo auxílio na minha estada no laboratório do IBT em São Paulo.

A **Adenilda Eugênia** e **Amanda Vasconcelos** secretárias do PPGCB e PROPESQ que me ajudaram muito em todas as necessidades inerentes à pós-graduação.

À Prof^a. Dr^a **Teresa Correia**, coordenadora do PPGCB pela paciência e auxílio nas questões da Pós-graduação.

À Prof^a Dr^a **Laise de Holanda Cavalcanti Andrade** pela oportunidade de estágio a docência e aos amigos da turma de Bacharelado em Ciências Biológicas 2010.1 e monitores da disciplina de Sistemática de Fanerógamas pelo companheirismo no estágio a docência.

Aos amigos **André Feitosa, Danilo de Albuquerque, Cezar Augusto, Flávio Augusto, Lúcio Flausino, Lucas Galindo, Robson Vieira, Ricardo Alves, Kelvin Rodrigues e Kathleen Lysak** e a todos os outros companheiros de viagem que são muito bons companheiros na viagem da vida.

A todos os amigos e colegas do LGBV, especialmente a **Karla Santana, José Ribamar Neto, Alberto Onofre, João Pacífico, Bruna Piereck, Lidiane Amorim, Hayana Azevedo, Arthur Wanderley, Ana Rafaela Oliveira, Valesca Pandolfi, Rodrigo Gazzaneo, Amaro Castro, Giovani Cavalcanti, Flávia Araújo, Pollyana Karla, Silvany Araújo e Ágatha Silva** e tantos outros que eu gosto muito pela amizade e apoio durante os trabalhos no laboratório.

Aos alunos de Iniciação Científica **Gabriela Gehlen, Marcos Silva, Wilka Nascimento, Rômulo Santos, Pedro Lima, Marx Lima** pela ajuda nos trabalhos e pela paciência.

Aos guias **Ir. Delmar, Seu Tula e Seu Licinho**, por terem me conduzido por caminhos seguros por esse Nordeste.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
Figura 1 – Diversidade de cores e hábitos nas Bromeliaceae. Composição fotográfica – Maria das Graças Lapa Wanderley. Fotos: Rafael Louzada/AndersonSantos/Suzana Martins	18
Figura 2 - Distribuição geográfica das Bromeliaceae nativas. A família é basicamente neotropical, ocorrendo apenas a espécie <i>Pitcairnia feliciana</i> no oeste africano. Fonte: Heywood (1993).	20
Figura 3. Aspecto geral da inflorescência de <i>Encholirium magalhaesii</i> L. B. Smith (foto do autor).	28
Figura 4. Variação morfológica em <i>Encholirium spectabile</i> . Adaptado de Forzza (2005).	32
Figura 5. Ecorregiões da Caatinga propostas por Velloso <i>et al.</i> (2002).	35
CAPÍTULO 2	Página
Figure 1 – A – Map with collect plots, population labels are indicated by the arrows. Black circles – Southern short pedicells populatios. Grey circles – northern populations with short pedicells. B – Nieghbor-joining dendogram showin split between southern (Black) and northern (Grey) populations. C – Structure graphic representig K=2. On the left side the scale indicates the sort of admixture in each individual (Q).	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	Página
Tabela 1 - Principais filogenias envolvendo as Bromeliaceae, marcadores usados, níveis de polimorfismos, número de espécies, grupo alvo e DNA alvo.	23
Tabela 2 - Espécies do gênero <i>Encholirium</i> , sua escala de ocorrência (ampla, média ou restrita) e locais de ocorrência. Fonte: Forzza <i>et al.</i> , 2010.	30
Tabela 3 – Principais estudos de genética de populações em Bromeliaceae.	48
CAPÍTULO 2	Página
Table 1. Primers name, sequences and Polymorphic Loci Generated on 96 individuals of <i>Encholirium spectabile</i> species complex.	86
Table 2. Within population indexes for each population. Northern populations presents more more polymorphisms than southern populations.	86
Table 3. Pairwise distances and geographic distances between populations, no correlation between the two tables are found. The values were in the most considerable.	87
Table 4. AMOVA results for different levels and ϕ_{st} for each population. The major differentiation is found within population.	87

LISTA DE ABREVIACÕES

AFLP	–	<i>Amplified Length Polymorphism</i> – Polimorfismos de Tamanho Amplificado
AMOVA	–	<i>Molecular Variance Analysis</i> - Análise Molecular de Variância
CIA	–	<i>Chlorophorm Isoamil Alcohol</i> – Clorofórmio Alcool Isoamílico
cpSSR	–	<i>Chloroplast Simple Sequence Repeat</i> – Sequências Simples Repetidas Cloroplastidiais
DAF	–	<i>DNA Amplification fingerprinting</i> – Impressão Genômica de DNA
EST	–	<i>Expressed Sequence Tags</i> – Etiquetas de Sequências Expressas
ETS	–	<i>Expressed Transcriber Spacer</i> – Espaçador Transcrito Expresso
ITS	–	<i>Internal Transcriber Spacer</i> – Espaçador Transcrito Interno
F_{is}	–	<i>Inbreeding coefficient</i> – Coeficiente de Endocruzamento
F_{st}	–	<i>Interpopulational differentiation index</i> - Índice de diferenciação interpopulacional
H_e	–	<i>Expected heterozygosity</i> – Heterozigosidade esperada
H_s	–	<i>Average heterozygosity</i> - Heterozigosidade média
H_t	–	<i>Total heterozygosity</i> – Heterozigosidade total
ISSR	–	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i> – Sequências Internas Simples Repetidas
RAPD	–	Random Amplified Polymorphic DNA – Amplificação Randômica de DNA Polimórfico
SNP	–	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de um único Nucleotídeo
SSR	–	<i>Simple Sequence Repeat</i> – Sequências Simples Repetidas
STMS	–	<i>Sequence Tagged Microsatellite Sites</i> – Sequências agrupadas em Sítios de Microsatélites
Φ_{st}	–	<i>Interpopulational differentiation index</i> – Índice de diferenciação interpopulacional.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
OBJETIVOS.....	17
OBJETIVO GERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
 CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1. Sistemática e Taxonomia e Evolução das Bromeliaceae.....	18
1.1. Considerações Gerais.....	18
1.2 Estudos Filogenéticos nas Bromeliaceae.....	22
1.2.1 Estudos Filogenéticos com as Tillandsioideae.....	24
1.2.2 Estudos Filogenéticos com as Bromelioideae.....	25
1.2.3 Estudos Filogenéticos com as Puyoideae.....	26
1.2.4 Estudos Filogenéticos com as Pitcairnioideae.....	27
1.3 O Gênero <i>Encholirium</i>	27
1.3.1 O complexo <i>Encholirium spectabile</i>	31
2. Caatinga.....	33
2.1 Caracterização do Domínio das Caatingas	31
2.2 <i>Inselbergs</i> – Um modelo de Ilhas Terrestres	37
3. Genética da Conservação e Delimitação de Espécies.....	39
4. Marcadores Moleculares e Genética de Populações em Bromeliaceae.....	42
4.1 Principais marcadores utilizados em Genética de Populações.....	42
4.1.1 Marcadores Dominantes.....	42
4.1.2 Marcadores Codominantes.....	44
4.1.3 Estudos de Genética de Populações em Bromeliaceae.....	46
5. Referências Bibliográficas.....	51

CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	65
Abstract.....	66
Introduction.....	67
Materials and Methods.....	71
Results.....	73
Discussion.....	75
References.....	81
Acknowledgments.....	84
CONCLUSÕES	87
ANEXOS.....	92
Anexo 1 – Instructions for authors.....	89
Anexo 2 – Resumo do X ALAG.....	95
Anexo 3 – Resumo do 62º CNBOT.....	96
Anexo 4 – Amplificação heteróloga de SSR desenvolvido para Bromeliaceae em <i>Encholirium spectabile</i>	97
Anexo 5 – Allele Report da Seleção de Primers de SSR.....	101
Anexo 6 – Figuras Suplementares.....	103
Anexo 7 – Tabelas Suplementares.....	105

RESUMO

A família Bromeliaceae é uma das mais diversificadas no território brasileiro e conta com cerca de 1.200 espécies das quais 1.024 são endêmicas. Esses vegetais apresentam muitas associações ecológicas não observáveis em outros grupos de plantas, como a ocorrência de tanques na base de suas rosetas e a polinização primariamente por beija-flores ou morcegos. *Encholirium spectabile* Mart. Ex Schult. f. é uma bromélia que apresenta uma correlação direta com afloramentos rochosos do Nordeste Brasileiro. Esta espécie possui uma grande plasticidade morfológica regional, sendo tratada como um complexo específico, fato que resultou na descrição incorreta de outros binômios relacionados, como *E. pernambucanum* L.B.Sm. & Read e *E. hoehneanum* L.B. Sm. Plantas estritamente rupícolas são tratadas como modelos para estudos de irradiação adaptativa, bem como para correlações entre a vegetação e mudanças climáticas ocorrentes no passado. Vários marcadores moleculares têm sido aplicados nesse sentido, entre eles marcadores do tipo *Fingerprinting* de DNA, incluindo marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*, Impressão Genômica do DNA Amplificado) e ISSR (*Inter Simple sequence Repeat*; Repetição Entre Sequências Simples). Indivíduos de nove populações de *E. spectabile* foram coletados, sendo distribuídos de norte a sul do Nordeste brasileiro, com populações nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia e Sergipe. Nesse estudo 99 *loci* polimórficos foram gerados. A amostragem apresentou heterozigosidade total de 0,3417, semelhante à reportada para outras espécies de *Encholirium* como *E. subsecundum* Mez. Dois grupos genéticos foram encontrados a partir de uma análise Bayesiana de agrupamentos ($k=2$) distribuídos regionalmente, resultado também evidenciado pelo agrupamento gerado pelo método de Neighbor-joining. A análise da estrutura genética mostrou que existem diferenças significativas entre as populações ($F_{st} = 0,3781$), porém pouca correlação entre distância genética e distância geográfica foi observada ($r = 0,3578$, $p \geq 0,033$), não sendo assim considerada. O compartilhamento de diversidade verificado pelo teste de AMOVA mostrou que a maior parte da diversidade está presente dentro das populações, o que é esperado para vegetais com reprodução clonal. A irradiação da espécie deve ter ocorrido do sul para norte, com dispersão em um modelo de ilhas. Este estudo concluiu que apesar da grande variação morfológica existente nesse complexo específico, *E. spectabile* compreende uma única espécie, onde cada morfotipo deve ser considerado como uma unidade para conservação *in situ*.

Palavras Chave – Bromeliaceae, *Encholirium*, ISSR, Marcadores Dominantes

ABSTRACT

Bromeliaceae is one of the most diverse families in Brazil, and has about 1,200 species of which 1,024 are endemic. These plants have many ecological associations not observed in other groups of plants, such as the occurrence of tanks on the basis of their rosettes and pollination primarily by hummingbirds and bats. *Encholirium spectabile* Mart. Ex Schult. f. is a bromeliad that has a direct correlation with rocky outcrops of the Brazilian Northeast, this species has a large regional morphological plasticity and is treated as a specific complex, a fact that resulted in incorrect description of other related binomials, such as *E. pernambucanum* L.B.Sm. & Read and *E. hoehneanum* L.B. Sm. Rupicolous plants are treated strictly as a model for studies of adaptive radiation, as well as correlations between vegetation and climate changes occurring in the past. Several molecular markers have been applied in this direction, including the DNA fingerprinting, including DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) and ISSR (*Inter Simple sequence Repeat*). Individuals from nine populations of *E. spectabile* were collected, distributed from north to south of the Brazilian Northeast, with populations in the states of Paraíba, Pernambuco, Bahia and Sergipe. In this study 92 polymorphic loci were generated. The total sample showed heterozygosity of 0.4655, which is reported for other *Encholirium* species such as *E. subsecundum* Mez. Two genetic groups were found from a Bayesian clusters analysis ($k = 2$), distributed regionally. The structure analysis showed that there are genetic differences between populations ($F_{st} = 0,3781$) and no correlation between genetic distance and geographic distance was observed ($r = 0,3578$, $p \geq 0,033$), what is not considerable. The sharing of diversity verified by test AMOVA showed that most of the diversity is present within populations, which is expected for plants with clonal reproduction. Irradiation of the species probably occurred from south to north and dispersion in an island model. This study demonstrated that although a great variation is present, this specific complex regards a single species and each morphotype should be considered as a unit for *in situ* conservation.

Key words – Bromeliaceae, *Encholirium*, ISSR, Dominant Markers

INTRODUÇÃO

Complexos específicos são comuns em vários grupos vegetais, inclusive nas Bromeliaceae que de um modo geral apresentam uma grande diversidade de espécies, possuem habito variado e uma grande quantidade de relações ecológicas identificadas. Esses complexos compreendem um dos mais sérios problemas para a delimitação específica. Cada entidade taxonômica deve ter um nome genérico e um epíteto específico próprio, para que as ações de conservação sejam eficientes (FRANKHAM *et al.*, 2002). Vários complexos específicos têm sido sinonimizados, especialmente com base em caracteres morfológicos. Por outro lado a eliminação formal de espécies é um problema presente em diversos grupos de plantas, sendo identificada também entre as Bromeliaceae (LEME, 2003).

Marcadores moleculares têm fornecido importantes informações para a compreensão acerca das relações em complexos específicos. Dentre os principais tipos de marcadores aplicados em genética de populações podem ser citados os enzimáticos (isoenzimas ou aloenzimas), os marcadores dominantes como, por exemplo, os AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados) e marcadores codominantes como os SSR (*Simple Sequence Repeats*; Repetições de Sequências Simples). Cada categoria de marcador apresenta vantagens e desvantagens. No entanto, polimorfismos são gerados e de um modo geral são informativos quando comparados com aspectos da história, distribuição e diversidade das espécies abordadas.

Estudos moleculares em complexos específicos, como no caso de *Vriesea gigantea* Mez, onde microssatélites foram aplicados entre dois morfotipos, revelaram grande diferenciação entre as populações com morfotipos diferentes (PALMA-SILVA, 2008). Por outro lado, no caso da espécie *Alcantarea imperialis* Harms, uma espécie restrita a inselbergues de Floresta Atlântica apresenta colorações da roseta diferenciadas em uma mesma população, podendo ser encontradas rosetas verdes e vermelhas. Estudos moleculares mostraram que não existe nenhuma diferença significativa entre os dois morfotipos (BARBARÁ *et al.*, 2007).

Encholirium spectabile é uma bromélia muito comum em afloramentos rochosos de todo sertão nordestino. Possui uma distribuição muito ampla, motivo pelo qual diversas outras espécies foram descritas e separadas, com base em caracteres morfológicos, como no caso de *E. pernambucanum*, *E. paraibae* L.B. Sm. & Read, *E. bahianum* L.B. Sm. & Read, *E.*

hoehneanum, *E. densiflorum* Ule etc. Entretanto, em um recente tratamento taxonômico sugeriu-se a manutenção de uma única espécie com grande variação morfológica (FORZZA, 2005).

Do ponto de vista ecológico *E. spectabile* é dominante na paisagem dos *inselbergs* de todo o semi-árido nordestino e ocorre em touceiras esparsas (GOMES & ALVES, 2011). Suas sementes normalmente germinam em fendas ou sobre algum suporte, o que explica sua distribuição sobre rochas. A produção de sementes é copiosa e sua germinabilidade em laboratório é muito boa, inclusive após um longo período de armazenamento. Em relação à reprodução a espécie se reproduz tanto sexuada como assexuadamente, ambas as estratégias reprodutivas são atribuídas a adaptações de sobrevivência em *inselbergs*. Em relação aos polinizadores, *E. spectabile* apresenta morfologia floral adaptada para quiropterofilia, pela posição das anteras e coloração das flores, e de fato morcegos *Glossophaga* spp. são registrados para a espécie (SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006). No entanto, outros visitantes florais foram registrados, como beija flores e abelhas generalistas. Essas diferenças têm impacto direto na estrutura e diversidade genética de cada população. *Inselbergs* são tratados do ponto de vista ecológico como ilhas terrestres, onde o padrão genético de espécies restritas a esses ambientes seria semelhante às ilhas oceânicas, considerando-se desse modo que a evolução ocorra de modo diferente do seu entorno. Portanto, espécies de *inselbergs* compreendem um modelo interessante para estudos evolutivos e filogeográficos. Esse tipo de estudo ainda é muito escasso no Nordeste brasileiro, de modo que os conhecimentos acerca das relações entre seus *inselbergs* ainda não foram amostrados.

Os afloramentos rochosos no Nordeste têm sua importância, visto que o seu elemento mais característico, *E. spectabile*, está presente tanto em afloramentos do sertão cujo clima é semi-árido, estando presentes também em enclaves de Floresta Atlântica, conhecidos como brejos de altitude na região do Planalto da Borborema, bem como ao norte da Cadeia do Espinhaço na região da Chapada Diamantina. A cadeia do Espinhaço é um dos principais centros de diversidade das Bromeliaceae dos neotrópicos, tratando-se de importante sítio onde adaptações e especiações ocorreram nesse grupo durante os séculos (VERSIEUX *et al.*, 2008).

A Floresta Atlântica também exerceu um papel capital na irradiação adaptativa das Bromeliaceae. No Sul da Bahia e entre os Estados de Pernambuco e Alagoas encontram-se dois centros de endemismos onde não só as bromélias, mas muitos outros grupos de plantas têm centros de diversidade (CARNAVAL & MORTIZ, 2008). Durante o período

pleistocênico a linha de influência polar alcançou latitudes mais baixas comprimindo as zonas tropicais e equatoriais. A flora polar se sobressaiu aumentando sua abrangência ao passo que as savanas, caatinga e principalmente florestas foram reduzidas (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Entretanto, em ambientes normalmente secos, as matas de galeria sofreram uma expansão, isolando a flora xérica existente. Por outro lado, os *inselbergs* devem ter sido influenciados de forma diferenciada da matriz. Até os dias atuais nenhum estudo correlacionou dados genéticos com a história evolutiva de populações de *inselbergs*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Analisar a estrutura genética populacional do complexo *Encholirium spectabile* em populações chave ocorrentes no semi-árido nordestino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar marcadores moleculares polimórficos em nível intra e interpopulacional informativos para estudos populacionais com *E. spectabile*.
- Analisar diversidade genética em cada população com base nas marcas moleculares de DAF e ISSR.
- Verificar os níveis de diferenciação genética entre as populações através de análises estatísticas para identificação de populações em divergência e possíveis subespécies no ‘complexo spectabile’.
- Correlacionar os dados genéticos com a distribuição geográfica.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Sistemática, Taxonomia e Evolução das Bromeliaceae

1.1. Considerações Gerais

A família Bromeliaceae compreende cerca de 19% das Angiospermas conhecidas (GIULIETTI *et al.*, 2005), com 60 gêneros e estimadas 3.140 espécies descritas, tratando-se de um grupo relativamente diversificado no que tange a seus hábitos, caracteres vegetativos e florais (Figura 1).



Figura 1 – Diversidade de cores e hábitos nas Bromeliaceae. Composição fotográfica elaborada por Maria das Graças Lapa Wanderley. Fotos: Rafael Louzada/ Anderson Santos/Suzana Martins

Do ponto de vista filogenético a família classifica-se no clado Poales (APGIII, 2009), estando distribuída segundo Givnish *et al.* (2007, 2011) em oito subfamílias: (I) Bromelioideae, que inclui plantas com frutos carnosos, como no caso do gênero *Ananas*; (II) Tillandsioideae, subfamília considerada claramente monofilética. Por sua vez, a subfamília Pitcairnioideae, anteriormente aceita a partir de dados morfológicos, mostrou-se polifilética pela análise realizada com o gene *ndhF* (GIVNISH *et al.*, 2007), sendo dividida em outros cinco grupos; (III) Brocchioideae, grupo que assumiu uma posição basal na análise; (IV) Lindmanioideae que se agrupou proximalmente ao grupo anterior, com bons valores de similaridade; (V) Puyoideae que inclui o gênero *Puya*; (VI) Navioideae que inclui *Navia* e outros gêneros relacionados; (VII) Hechtioideae que agrupa o gênero *Hechtia* e por fim, (VIII) Pitcairnioideae, que inclui *Pitcairnia* e gêneros associados a ambientes xéricos, como *Dyckia* e *Encholirium*. Embora a maioria das espécies seja bem delimitada morfológicamente, é comum encontrar certa plasticidade nos caracteres morfológicos (ZIZKA *et al.*, 2009).

Os diferentes tipos de hábitos (epifítico, terrestre e rupícola) contribuíram para sua diversificação e adaptação aos diferentes tipos de ambientes, possibilitando a ampla distribuição que abrange desde matas neotropicais úmidas até áreas secas como savanas, campos rupestres e regiões semi-áridas (BENZING, 2000; GIVNISH, 2004; ZIZKA *et al.*, 2009).

Bromeliaceae é uma das famílias mais recentes do ponto de vista evolutivo, possuindo distribuição neotropical com limites entre o sul dos Estados Unidos e norte da Patagônia, com centro de diversidade no Brasil Central, em especial no domínio da Floresta Atlântica, e nos Andes desde o Peru até o México. No continente africano, existe apenas a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr. (Figura 2), a qual provavelmente dispersou-se em longa distância (POREMBSKI & BARTHLOTT 1999; GIVNISH, 2004; ZIZKA *et al.*, 2009).

Segundo estudos moleculares e filogeográficos, as Bromeliaceae teriam seu centro de origem no planalto das Guianas, tendo colonizado a América Central, os Andes e o Brasil por irradiação adaptativa (GIVNISH *et al.*, 2011). No território brasileiro houve duas colonizações, uma diretamente do planalto das Guianas e outra através dos Andes. Os Andes foram colonizados três vezes, inicialmente pelas Tillandsioideae, depois por *Fosterella* e por fim pelo gênero *Puya*. Considera-se que o Brasil também foi colonizado por três eventos distintos, inicialmente pelo grupo *Cottendorfia*, depois pelo grupo *Dyckia-Encholirium* e por fim pelas Bromelioideae. O mesmo estudo considera que *Pitcairnia*, *Navia*, *Hechtia*, *Dyckia* e

Puya provavelmente os grupos de evolução mais recente em Bromeliaceae (GIVNISH *et al.*, 2007, 2011).



Figura 2 - Distribuição geográfica das Bromeliaceae nativas. A família é basicamente neotropical, ocorrendo apenas a espécie *Pitcairnia feliciania* no oeste africano. Fonte: Heywood (1993).

A última filogenia molecular, baseada em DNA cloroplastidial, evidencia que os gêneros *Dyckia*, *Encholirium*, *Fosterella* e *Deuterocohnia* – todos pertencentes às Pitcairnioideae – emergiram em um evento cladogenético ocorrido provavelmente na região central dos Andes, cerca de 8,5 milhões de anos atrás, compreendendo um dos eventos evolutivos mais recentes das Bromeliaceae no domínio brasileiro (GIVNISH *et al.*, 2011).

As Bromeliaceae apresentam distribuição ampla no novo continente (Figura 2), principalmente nas zonas neotropicais onde se encontra a maioria das espécies endêmicas, com destaque para o Brasil, onde as Bromeliaceae são representadas por 42 gêneros e cerca de 1.200 espécies, sendo o segundo maior grupo dentre as monocotiledôneas. Neste grupo 22 gêneros e 1.029 espécies são endêmicos (FORZZA *et al.*, 2010). No domínio brasileiro, a Cadeia do Espinhaço é um dos pontos de maior diversidade, com localização entre os estados de Minas Gerais e Bahia, compreendendo uma formação geológica do Proterozóico onde 7% das espécies de Bromeliaceae ocorrem, com diversos endemismos (VERSIEUX *et al.*, 2008).

Floras e flóruas de Bromeliaceae têm sido realizadas durante os anos, onde se destacam a Flora Neotropical, um clássico para todas as famílias dos neotrópicos (SMITH & DOWNS, 1979); a Flora Catarinense, que apresenta 15 gêneros e cerca de 100 espécies (REITZ, 1983), a Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso, com 13 gêneros e 42 espécies (WANDERLEY & MOLLO, 1992); a Flora de Grão Mogol (7 gêneros e 17 espécies)

(WANDERLEY & FORZZA, 2003), bem como a Flora do Estado de São Paulo que apresenta descrições para 18 gêneros e 154 espécies (WANDERLEY & MARTINS, 2007). Diversas revisões taxonômicas foram realizadas para gêneros específicos, como *Portea*, *Lymania*, *Encholirium* e *Orthophytum* (; COFFANI-NUNES, 2004; SOUZA, 2004 FORZZA, 2005; LOUZADA *in prep.*).

No que tange ao tratamento taxonômico, as Bromeliaceae são consideradas como um grupo que apresenta um conjunto de sinapomorfias, que compreendem ervas de folhas alternas espiraladas em forma de roseta, com venação paralelinérvea e geralmente com presença de acúleos. Apresentam inflorescências cimosas ou racemosas. Suas flores são geralmente vistosas e bissexuadas, de simetria actinomorfa ou ligeiramente zigomorfas, diclamídeas e heteroclamídeas. Apresentam três sépalas fusionadas ou não, com prefloração imbricada; corola trímera, dialipétala ou gamopétala, também com prefloração imbricada. Os estames são em número de seis, livres ou unidos entre si ou adnatos à corola. As anteras têm deiscência rimosa. Os nectários septais são geralmente presentes. O gineceu é gamocarpelar, o é ovário súpero ou ínfero, trilocular de placentação axial, pluriovulado. O fruto pode ser uma cápsula ou baga, às vezes formando um sincarpo, como no caso do abacaxi (gênero *Ananas*) (SOUZA & LORENZI, 2008).

A família apresenta inúmeras adaptações reconhecidas, como metabolismo CAM, tricomas absorventes ou tanques para o acúmulo de água (ZIZKA *et al.*, 2009). Do ponto de vista ecológico possuem interações com inúmeros tipos de animais, sendo seus tanques ambientes para a reprodução de espécies de anfíbios, onde as bromélias oferecem o espaço e captam o nitrogênio proveniente do metabolismo de anuros arbóreos (ROMERO *et al.*, 2010). Beija-flores e morcegos são seus principais polinizadores, porém abelhas, besouros e vespas também são visitantes florais, muitas vezes devido à presença de recompensas florais como néctar e pólen (e.g. SAZIMA *et al.*, 1989; SIQUEIRA-FILHO *et al.*, 1998).

Citogeneticamente o grupo é caracterizado por um conjunto haplóide de $n=25$, porém poliplóides naturais também são encontrados (COTIAS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2000; GITAÍ *et al.*, 2005). Análises cariológicas em Bromeliaceae ainda são restritas a contagens cromossômicas, inexistindo dados de bandejamento ou hibridização *in situ*.

Estudos moleculares com Bromeliaceae têm sido limitados pela grande similaridade nos genes geralmente utilizados com tal finalidade, incluindo marcadores dominantes como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Amplificação Aleatória de Polimorfismos de DNA), codominantes como os SSR (*Simple Sequence Repeat* – Sequências Simples

Repetidas) e marcadores haplotípicos como os cpSSR (*Chloroplast Simple Sequence Repeat* – Sequências Cloroplastidiais Simples Repetidas), gerando informações para o grupo, seja para filogenia molecular ou para estudos populacionais em táxons específicos (e.g.; CAVALLARI *et al.*, 2006; BARBARÁ *et al.*, 2007; PALMA-SILVA *et al.*, 2009).

1.2 Estudos Filogenéticos nas Bromeliaceae

Em termos filogenéticos, as Bromeliaceae apresentam baixa diversidade genética ao ser comparada com outras angiospermas (Tabela 1), em face da grande diversidade no tocante a características fenotípicas e fisiológicas, tanto em nível de família como de subfamílias ou gênero (e.g.: TERRY *et al.*, 1997; BARFUSS *et al.*, 2005; CHEW *et al.*, 2010). Estudos filogenéticos com uso de marcadores cloroplastidiais (como os genes *matK* e *rps16*) apresentam níveis de variabilidade em torno de 14%, o que é considerado baixo em comparação com outras Angiospermas. Em contrapartida, novos marcadores e a junção de marcas nucleares e plastidiais têm aumentado a resolução das filogenias em Bromeliaceae, o que sugere que as próximas filogenias sejam mais confiáveis.

Terry *et al.* (1997) propuseram uma filogenia para a família, com 30 espécies de 29 gêneros diferentes, dos quais 15 de Bromelioideae, oito de Pitcairnioideae e seis de Tillandsioideae (sistema proposto por Cronquist em 1981). O estudo se utilizou de polimorfismos apresentados no gene *ndhF*, sendo que os valores de divergência para este gene em Bromeliaceae foi muito menor (2,5%) do que o reportado na época para outras famílias. O trabalho revelou que os grupos aceitos na época não se sustentavam, em especial por não dar suporte aos gêneros *Navia*, *Puya* e *Brocchinia* dentro de Pitcairnioideae. Devido à restrição do gênero *Navia* a região da Guiana e Venezuela, morfologia de sementes e ontogenia sugeriu-se que o gênero fosse tratado como distinto das demais subfamílias. Outras distinções dentro de Pitcairnioideae foram desconsideradas devido a evidências morfológicas, fisiológicas e ecológicas presentes em todos os subclados gerados (TERRY *et al.*, 1997).

Tabela 1 - Principais filogenias envolvendo as Bromeliaceae, marcadores usados, níveis de polimorfismos, número de espécies, grupo alvo e DNA alvo.

Artigo	Marcador	Nível de Polimorfismos	Número de Espécies	Alvo	DNA nuclear	cpDNA
Terry <i>et al.</i> , 1997	<i>ndhF</i>	2,5%	25	Bromeliaceae	x	
Barfuss <i>et al.</i> , 2005	<i>rps16, trnL, trnL-trnF, atpB-rbcL, rbcL+rbcL-accD, matK+trnK</i>	14%	104	Tillandsioideae		x
Givnish <i>et al.</i> , 2007	<i>ndhF</i>	Não informado	35	Bromeliaceae	x	
Rex <i>et al.</i> , 2007	AFLP	96%**	77	<i>Fosterella</i>	x	
Schulte <i>et al.</i> , 2009	<i>PRK, matK, trnL, trnL-trnF, atpB-rbcL</i>	14,2%	48	Bromelioideae		x
Rex <i>et al.</i> , 2009	<i>matK, rps16, atpB-rbcL, psbB-psbH</i>	12%	60	<i>Fosterella</i>		x
Chew <i>et al.</i> , 2010	<i>ITS e ETS</i>	14%	85	<i>Tillandsia</i> subg. <i>Tillandsia</i>		x
Sass & Specht, 2010	<i>rbp2, EST, g3pdh, trnL-F</i>	18%	150	<i>Aechmea</i>		x
Jabaily & Sistma, 2010	<i>PHYC, atpF, rps16, matK, trnS-trnG</i>	6%	75*	Puyoideae	x	x
Givnish <i>et al.</i> , 2011	<i>matK, rps16, atpB-rbcL, psbA-trnH, rpl32-trnL, trnL-trnF, trnL intron</i>	16,2%	90	Bromeliaceae		x

*Apenas 36 *Puya* ** Note um marcador diferenciado.

As observações realizadas por Terry *et al.* (1997) foram posteriormente corroboradas por outros estudos com marcadores moleculares adicionais, de modo que Givnish *et al.* (2007, 2011) propuseram oito subfamílias para as Bromeliaceae (Figura 3), onde as Bromelioideae - inclusive o gênero *Aechmea* e seus gêneros aparentados - seriam a subfamília mais derivada. Por sua vez, a subfamília Puyoideae, que inclui o gênero *Puya* (anteriormente tratado como Pitcairnioideae), teria uma maior ligação com as Bromelioideae. Os grupos Pitcairnioideae s.s. e Navioideae apresentaram uma posição mais basal e surgiram como um clado primitivo em relação às subfamílias Puyoideae e Bromelioideae. As Hechtioideae compuseram um ramo diferenciado dentro das Bromeliaceae, estando este mais associado às Tillandsioideae. Lindmanioideae e Brocchinioideae posicionaram-se em ramos basais dentro das Bromeliaceae.

1.2.1 Estudos Filogenéticos com as Tillandsioideae

A subfamília Tillandsioideae certamente é uma das mais controversas, em vista das constantes mudanças na nomenclatura das espécies, devido à sua diversidade de hábitos e por suas características morfológicas bem diferenciadas. Esta subfamília agrupa os gêneros *Alcantarea*, *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Guzmania*, *Mezobromelia*, *Raccinea*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Viridantha* e *Werauhia*, sendo *Tillandsia* subdividido em várias sessões. Na maioria dos estudos filogenéticos de Bromeliaceae, este grupo apresentou-se monofilético, com ressalvas apenas para *Glomeropitcairnia* e *Catopsis* (TERRY *et al.*, 1997; HORRES *et al.*, 2000). Esse grupo foi tratado com uma filogenia molecular por Barfuss *et al.* (2005), onde sua monofilia foi corroborada. Os gêneros considerados em estudos anteriores como filogeneticamente problemáticos foram incluídos no grupo das Tillandsioideae. Segundo esses autores, dois grandes clados são suportados dentro da subfamília, um relacionado ao gênero *Vriesea* e outro relacionado aos demais gêneros.

Do ponto de vista filogeográfico considera-se que as Tillandsioideae apresentem como origem a região centro sul-americana com irradiações para o leste brasileiro, Caribe e Andes, tendo mais tarde chegado a outras áreas da América Central, inclusive o México. O gênero *Tillandsia* aparenta uma história evolutiva recente, dada a fraca resolução dos cladogramas moleculares, sugerindo uma evolução rápida e ainda não fixada a partir de grupos andinos (BARFUSS *et al.*, 2005).

Tillandsia é um gênero bastante diversificado e abrange diversos ambientes e adaptações relacionados a eles. Utilizando marcadores ITS (*Internal Transcribed Spacer* - Espaçador Transcrito Interno) e ETS (*Expressed Transcribed Spacer* – Espaçador Transcrito Expresso), que se mostraram promissores na geração de polimorfismos filogeneticamente informativos no grupo das Bromeliaceae, Chew *et al.* (2010) verificaram que o pseudobulbo confere vantagens em ambientes xéricos por armazenar água, estando este presente em 11 espécies, as quais não formaram um grupo filogenético natural. Além disso, o pseudobulbo aparenta alguma relação com os mimercófitos radiculares, como estruturas análogas e provavelmente de mesma origem.

1.2.2 Estudos Filogenéticos com as Bromelioideae

As Bromelioideae e as Tillandsioideae são derivadas das Pitcairnioideae s.s., as quais apresentam uma maior diversidade de hábitos e adaptações não visualizáveis nas Pitcairnioideae (TERRY *et al.*, 1997; GIVNISH *et al.*, 2007, 2011). As Bromelioideae são tratadas como um grupo monofilético, tanto em nível molecular como morfológico (*e.g.* GIVNISH *et al.*, 2007; SCHULTE *et al.*, 2009), porém, várias características morfológicas que delimitavam a subfamília compreendiam homoplasias ou falhavam em delimitar os grupos naturais, visto que gêneros apresentavam-se definidos por uma única combinação de caracteres em lugar de sinapomorfias tradicionais.

Schulte *et al.* (2009) utilizaram locos nucleares de baixo número de cópias como fonte de polimorfismos para delimitar filogeneticamente a subfamília Bromelioideae, sustentando a monofilia de Bromelioideae e Puyoideae como grupo irmão. Alguns clados bem definidos são observados na filogenia, sendo um o clado central das Bromelioideae (Chamado de *core* Bromelioideae) essencialmente relacionado ao gênero *Aechmea* e outro grupamento com os gêneros *Fascicularia*, *Ochagavia* e gêneros relacionados a estes. Por fim o gênero *Bromelia* como mais basal na subfamília e grupo irmão de todas as Bromelioideae. O gênero *Fernsea*, que aparenta ser relacionado com os demais membros do gênero *Bromelia*, se agrupou como basal das Eubromelioideae. *Cryptanthus* e *Orthophytum* também agrupam em um clado dentro das Eubromelioideae, porém *Orthophytum* apresentou-se parafilético.

Duas características bastante relevantes do ponto de vista da evolução das Bromelioideae, compreendem a simetria das sépalas e a presença de tanques. Acreditava-se que o caráter ‘sépalas assimétricas’ era mais basal no grupo, entretanto na filogenia proposta ficou evidente que esta característica seria mais derivada, embora presente em dois diferentes grupos dentro do clado. A presença de tanque na roseta se apresentou como característica bastante derivada dentro do *core*-Bromelioideae (SCHULTE *et al.*, 2009).

Acredita-se que as Bromelioideae tiveram origem na Floresta Atlântica brasileira com contínuas diversificações na América do Sul, Andes e América Central, não apenas em um único evento, mas em eventos subsequentes e relacionados a fenômenos edafoclimáticos (SCHULTE *et al.*, 2009; SASS & SPECHT, 2010).

Um dos gêneros com comportamento polifilético é *Aechmea*, que se agrupa com vários outros grupos de Bromelioideae, como *Quesnelia* e *Chevaliera*. Este gênero possui uma grande variação do ponto de vista morfológico que interfere na sua delimitação

taxonômica, levando a arranjos subgenéricos artificiais. Uma filogenia baseada em EST (*Expressed Sequence Tags* – Etiquetas de Sequências Expressas) e alguns genes comumente utilizados para estudos infragenéricos uniu *Aechmea* e o *core*-Bromelioideae como um grupo monofilético no qual dois outros clados são visíveis, um mais basal e irmão de todas as outras Bromelioideae relacionado à América Central, um outro clado mais derivado que agrupa a grande maioria das *Aechmea*, porém com outros gêneros inclusos.

O mais interessante é que a filogenia corrobora com a distribuição espacial de *Aechmea* e gêneros relacionados. O grupo *Chevaliera*, por exemplo, se agrupa em um clado basal e parece ser menos relacionado ao gênero *Aechmea*, onde sua inclusão é questionável. Outro clado agrupa as *Aechmea* relacionadas à Floresta Atlântica e ao leste brasileiro, no qual o subgênero *Ortgiesia* encontra-se agrupado. Um grupo contendo as *core-Aechmea* com 93 espécies também ficou evidente, porém com pouco suporte de *bootstrap*, embora envolvesse táxons bastante relacionados morfológicamente entre si (SASS & SPECHT, 2010).

1.2.3 Estudos Filogenéticos com as Puyoideae

A subfamília Puyoideae abriga unicamente o gênero *Puya*, sendo objeto de controvérsias do ponto de vista filogenético, pois eram inicialmente clusterizadas dentro das Pitcairnioideae s.l., sendo atualmente vistas como grupo irmão das Bromelioideae (e.g.: GIVNISH *et al.*, 2007, 2011). Do ponto de vista morfológico são distinguíveis dois subgêneros: (i) *Puya*, baseado na presença de partes estéreis no ápice das inflorescências, e (ii) *Puyopsis*, sem essas estruturas, separação esta que foi confirmada pela filogenia. Levando em conta também a distribuição, considera-se que *Puya* seja um grupo monofilético, compreendendo dois clados, um relacionado ao Chile (*Puya*) e outro relacionado aos Andes (*Puyopsis*). As espécies analisadas se agruparam na filogenia de acordo com distribuição geográfica e não a partir de caracteres adaptativos (JABAILY & SISTMA, 2010).

As *Puya* chilenas são consideradas como primitivas e a região do central Chile como importantíssima para a evolução do grupo, inclusive como zona de eventos de hibridização e introgressão. Tal argumento baseia-se em diferenças observadas em filogenias a partir de DNA nuclear e cloroplastidial (cpDNA). De um modo geral, as *Puya* chilenas compreendem a um grupamento específico dentro da subfamília, o que já era de se esperar, dada a grande

diversidade de nichos, espécies e ambientes singulares na América do Sul presentes apenas no Chile (ZIZKA *et al.*, 2009; JABAILY & SYSTMA, 2010).

1.2.4 Estudos Filogenéticos com as Pitcairnioideae

Os estudos com as Pitcairnioideae ainda são reduzidos e restritos a análises do gênero *Fosterella*, presente em ambientes xerofíticos dos Andes peruanos, da Amazônia brasileira, do norte do Paraguai e da Argentina, apresentando uma disjunção quanto à distribuição de *F. micrantha* que se divide em três regiões descontínuas. Seis diferentes linhagens de *Fosterella* são visualizadas, sendo referidas como grupos *rusbyi*, *albicans*, *weberbaueri*, *micrantha*, *weddeliana* e *penduliflora*. As espécies possuem um padrão filogenético bastante conflitante quanto à distribuição geográfica, como no caso de *rusbyi* e *albicans* que compreendem espécies de ambientes diferentes, que intuitivamente não seriam correlacionadas. Dentro do clado *rusbyi*, a espécie andina, *F. rusbyi*(Mez) L. B. Sm. estaria mais relacionada com as brasileiras *F. vasquezii* E.Gross & Ibisch, *F. windischii* L.B.Sm. & Read e *F. yuvinkae* Ibisch, R.Vásquez, E.Gross & S.Reichle de terras baixas e alagadas do Pantanal brasileiro. Estes dois grupos são morfologicamente muito diferentes. Um grupo andino também é evidenciado, incluindo *F. floridensis* Ibisch, R.Vásquez & E.Gross e *F. spectabilis* H. Luther de áreas semi-úmidas (REX *et al.*, 2009).

1.3 O Gênero *Encholirium*

O Gênero *Encholirium* Mart. Ex. Schult & Schultes f. foi descrito em 1828 por Spix & Mauritius. O espécime tipo (*E. spectabile*) foi coletado na Ilha do Fogo, entre Juazeiro (Bahia) e Petrolina (Pernambuco), em uma ilha do Rio São Francisco. Em 1830, os autores da espécie a posicionaram no gênero *Encholirium*. Em 1889, este gênero foi reposicionado como subgênero de *Dyckia* – seu grupo irmão – devido a várias características compartilhadas, como o tipo e a morfologia do fruto. Porém, o gênero foi mais uma vez restabelecido em 1894 pelo botânico Mez (FORZZA, 2005).

Do ponto de vista morfológico o gênero é caracterizado por compreender plantas herbáceas terrestres, com raízes funcionais, folhas rosuladas, de margem inteira e aculeada, crassas, escapo floral verde ou castanho (a depender do estágio de desenvolvimento)

emergindo do centro da inflorescência (Figura 3). As inflorescências são do tipo racemo ou espigas, apresentam um número de duas (em *E. biflorum*) a muitas flores em sua maioria verdes ou amareladas, por vezes nas cores lilás e laranja. As flores são completas, hipóginas e bissexuais, trímeras, actinomorfas, diplostêmones. O ovário é súpero, tricarpelar, com muitos óvulos e placentação axial. O fruto é seco do tipo cápsula septicida, com inúmeras sementes empilhadas. As sementes são aladas e comumente dispersas pelo vento (FORZZA, 2005).

O gênero é bastante comum em altitudes de 400 a 800 m compondo a fisionomia de muitos afloramentos rochosos no Nordeste (GOMES & ALVES, 2009). Segundo Forzza (2001) as espécies de *Encholirium* nunca co-ocorrem, estando sempre desassociadas por características do habitat, compreendendo populações normalmente grandes, porém muitas vezes restritas a localidades únicas.



Figura 3. Aspecto geral da inflorescência de *Encholirium magalhaesii* L. B. Smith. (foto do autor).

A polinização para algumas espécies aparenta ser primariamente quiropterofílica; no entanto, abelhas e beija-flores também são visualizados como visitantes florais, embora não existam registros de polinização efetiva. A presença de protoginia (quando as flores amadurecem a parte feminina antes da masculina) evita temporalmente a autofecundação. A dispersão em *Encholirium*, como na maioria das espécies anemocóricas, tem um alcance muito limitado. Apesar de boa germinabilidade em laboratório, o estabelecimento de novos indivíduos em ambientes naturais parece ser mais raro, a depender de solo para o estabelecimento das plântulas. Além disso, a predação de sementes por larvas de insetos é muito comum (SAZIMA *et al.*, 1989; FORZZA, 2001, 2005; LORENZON *et al.*, 2003; CAVALLARI *et al.*, 2006; LEAL *et al.*, 2006; SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006). Por outro lado, considera-se a reprodução clonal como uma estratégia presente, onde rosetas emergem de estolões, que muitas vezes se degeneram com o tempo (CAVALLARI *et al.*, 2005).

Espécies do gênero *Encholirium* são comuns em afloramentos cristalinos do leste Brasileiro, tendo seu centro de diversidade e de endemismo na Cadeia do Espinhaço e na Serra do Cipó (VERSIEUX *et al.*, 2008). O gênero é característico dos ecossistemas de Caatinga, Cerrado, Campos Rupestres, bem como em afloramentos de Floresta Atlântica no Nordeste (Tabela 2) (FORZZA, 2001; SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006). Quatro novas espécies, *E. cnetocephalum* Forzza ex. Zappi, *E. agavioides* Forzza ex. Zappi, *E. pulchrum* Forzza, Leme & Ribeiro e *E. diamantinum* Forzza foram recentemente descritas para o gênero, ambas ocorrentes na Serra do Cipó em Minas Gerais e no Planalto da Diamantina (FORZZA & ZAPPI, 2011; FORZZA *et al.*, 2012). A maioria das espécies de *Encholirium* tem distribuição restrita e ocorre na Serra do Cipó, embora algumas possuam distribuição mais ampla, como *E. subsecundum* (Baker) Mez, *E. brachypodum* L. B. Sm & Read e *E. spectabile*, as quais têm sido reportadas em diversos levantamentos florísticos nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. No Nordeste três espécies são reportadas, *E. spectabile* de ampla distribuição, *E. brachypodum* ocorrente apenas no Sul da Bahia e *E. erectiflorum* L. B. Sm. para a Caatinga do Piauí e Ceará (OLIVEIRA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009). Dois grandes grupos são sugeridos para o gênero, sendo que um compreende as espécies de pedicelo mais longo (*longipedicellatum*), incluindo *E. reflexum* Forzza & Wanderley, *E. biflorum* (Mez) Forzza, *E. heloisae* (L. B. Sm) Forzza & Wanderley, *E. vogelii* Rauh, *E.*

scrutor (L. B. Sm.) Rauh e *E. pedicellatum* (Mez) Rauh; enquanto o segundo abrange espécies de pedicelos mais curtos (RAUH, 1987; FORZZA, 2005).

Nas filogenias mais recentes para a família (GIVNISH *et al.*, 2007, 2011) onde os grupos *Encholirium*/*Dyckia* foram inclusos, o agrupamento se deu em clados bastante derivados e separados do grupo principal das Pitcairnioideae. A partir de uma filogenia baseada em genes cloroplastidiais (REX *et al.*, 2009) argumenta-se que *Dyckia*, *Encholirium* e *Deuterocohnia* compreendam táxons estreitamente aparentados, considerados como grupo irmão de *Fosterella*.

Tabela 2 - Espécies do gênero *Encholirium*, sua escala de ocorrência (ampla, média ou restrita) e locais de ocorrência. Fonte: Forzza *et al.*, 2010.

Espécie	Escala de Ocorrência	Locais de Ocorrência
<i>E. brachypodum</i> L.B.Sm. & Read	Ampla	Sul da Bahia
<i>E. spectabile</i> Mart. ex Schult.	Ampla	Centro Norte da Bahia, Norte do São Francisco até o Sul do Piauí
<i>E. subsecundum</i> (Baker) Mez	Ampla	Cadeia do Espinhaço – MG
<i>E. erectiflorum</i> L. B. Sm.	Média	Restrito a Afloramentos no Piauí, Ceará e Pernambuco
<i>E. horridum</i> L. B. Sm.	Média	MG e ES
<i>E. luxor</i> L.B.Sm. & Read	Média	Goiás, DF e Norte de Minas Gerais
<i>E. maximum</i> Forzza & Leme	Média	Goiás e Oeste Baiano
<i>E. agavioides</i> Forzza & Zappi	Restrita	Serra do Cipó – MG
<i>E. ascendens</i> Leme	Restrita	Caatinga - MG
<i>E. biflorum</i> (Mez) Forzza	Restrita	Serra do Cipó – MG
<i>E. cnetocephalum</i> Forzza	Restrita	Serra do Cipó – MG
<i>E. eddie-stevesi</i> Leme & Forzza	Restrita	Niquelândia – GO
<i>E. heloisae</i> (L.B.Sm) Forzza & Wand	Restrita	Santana do Riacho – MG
<i>E. irwini</i> L. B. Sm.	Restrita	Grão Mogol - MG
<i>E. lymanianum</i> E.Pereira & Martinelli	Restrita	MT e MS
<i>E. magalhaesi</i> L.B.Sm.	Restrita	Planalto da Diamantina - MG
<i>E. pedicellatum</i> (Mez) Rauh	Restrita	Planalto da Diamantina - MG
<i>E. reflexum</i> Forzza & Wand	Restrita	Diamantina e Grão Mogol - MG
<i>E. scrutor</i> (L.B.Sm) Rauh	Restrita	Cadeia do Espinhaço - MG
<i>E. vogelii</i> Rauh	Restrita	Santana do Riacho - MG
<i>E. diamantinum</i> Forzza	Restrita	Diamantina - MG
<i>E. pulchrum</i> Forzza, Leme, Ribeiro	Restrita	Itambé do Mato Dentro - MG

Várias espécies de Himenópteros e Hemípteros são ocasionalmente encontradas nas inflorescências/infrutescências de *Encholirium*. Larvas de insetos são predadoras de sementes.

Há registros de que as abelhas da espécie *Xylocopa abbreviata* Hurd & Moure nidificam suas proles em hastes de *E. spectabile*. Trata-se de um inseto de distribuição restrita e seu registro foi feito apenas em afloramentos rochosos onde ocorrem espécies do gênero *Encholirium*. Quando estão iniciando o estágio de dispersão dos frutos, esses animais normalmente escavam seus ninhos nas hastes da planta no estágio em que o escapo da inflorescência está com coloração marrom, nunca em estágios iniciais ou quando as hastes estão muito velhas (RAMALHO *et al.*, 2004).

Devido à grande quantidade de endemismos e constantes pressões antrópicas (como a construção de estradas ou empreendimentos rurais), algumas espécies de *Encholirium* estão listadas entre aquelas ameaçadas de extinção, como *E. biflorum* e *E. pedicellatum* (CAVALLARI, 2004).

1.3.1. O Complexo *Encholirium spectabile*

Encholirium spectabile Mart. ex Schult é uma espécie bastante difundida em afloramentos rochosos do nordeste setentrional brasileiro, no qual está a maior abrangência de todo o gênero. Habitam desde o norte do Ceará, até a região da Chapada Diamantina ao sul da Bahia, com limites entre a Caatinga a oeste e a Floresta Atlântica a leste, com ocorrência em alguns brejos de altitude (SMITH & DOWNS, 1974; FORZZA, 2005; SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006).

A espécie caracteriza-se de um modo geral por suas hastes em forma de seta, inflorescências do tipo racemo, laxas a congestas, flores vistosas de cor amarelada, pediceladas a curto-pediceladas. Devido à sua ampla distribuição esta espécie possui uma grande variação no que tange a outros caracteres usualmente utilizados no discernimento das espécies (Figura 4), como as brácteas do escapo ou da inflorescência, o que levou à descrição de espécies distintas, como *E. pernambucanum* e *E. densiflorum*, atualmente sinônimos de *E. specabile*. Uma pequena população dessa espécie encontra-se localizada na Ilha do Fogo, entre as cidades de Petrolina e Juazeiro, de onde provém o espécime tipo. As espécies dos municípios de Jacobina e Morro do Chapéu, na região norte da Cadeia do Espinhaço, apresentam extremos de variação com flores menores que as brácteas florais. Um gradiente geográfico de caracteres é observável, de modo que várias espécies dentro do complexo

Encholirium spectabile foram sinonimizadas. É possível encontrar indivíduos floridos entre os meses de novembro e dezembro e entre junho e julho (FORZZA, 2005).

	pedicelo compr. (cm)	bráctea floral compr. x larg. (cm)	sépala compr. x larg. (cm)	pétala compr. x larg. (cm)	forma da bráctea floral 1:1	procedência
Martinelli 7669	0,4	1,8 x 0,5	1,1 x 0,6	1,3 x 0,6		Cultivado
Amorim 1821	0,5	1,5 x 0,3	1,0 x 0,6	1,6 x 0,9		Jacobina (BA)
Andrade 28645	0,5	1,2 x 0,6	0,9 x 0,7	1,4 x 0,7		Milagres (BA)
Zehntner s.n. (R 46182)	0,7	0,5 x 0,3	0,9 x 0,7	2,2 x 0,9		sem procedência
Heringer 347	0,8	1,9 x 0,5	1,2 x 0,8	2,0 x 0,9		Petrolina (PE)
Fonseca 138	0,8	1,1 x 0,3	0,8 x 0,6	2,2 x 1,0		Monte Alegre (SE)
Campos-Porto s.n. (R. 74879 <i>in part</i>)	1,0	1,1 x 0,1	0,7 x 0,6	0,9 x 0,6		sem procedência
Castellanos 22846	1,2	1,9 x 0,5	0,9 x 0,6	2,1 x 0,6		Sebastianópolis (RN)
Bandeira 87	1,5	0,5 x 0,2	0,7 x 0,3	2,2 x 0,4		Bahia

Figura 4. Variação morfológica em *Encholirium spectabile*. Adaptado de Forzza (2005).

A espécie *E. spectabile* aparenta ser quiropterofílica, devido à sua coloração e morfologia floral. Há registros de *Glossophoga soricina* (Glossophagine) visitando a espécie,

porém outros visitantes florais como abelhas generalistas (Apidae) e beija-flores (LORENZON *et al.*, 2003; LEAL *et al.*, 2006; SIQUEIRA-FILHO & LEME, 2006) já foram reportados. As flores de *E. spectabile* são hermafroditas (MACHADO *et al.*, 2006), seu sistema reprodutivo foi estudado, embora não existam dados publicados.

Forzza *et al.* (2005) identificaram o binômio *E. pernambucanum* como um sinônimo de *E. spectabile*, porém Siqueira-Filho & Leme (2006) refutaram esta sinonímia, considerando os caracteres de flores inconspicuamente pediceladas e pétalas mais largas, visando evitar o risco da chamada extinção formal de espécies, onde espécies muito aparentadas são sinonimizadas apesar de apresentarem grande variabilidade morfológica (LEME, 2003).

2. Caatinga

2.1. Caracterização do Domínio das Caatingas

O domínio das Caatingas é genuinamente brasileiro, apresentam uma formação singular no globo que se caracteriza por uma vegetação caducifólia de fisionomia e florística variadas. Do ponto de vista climático, caracteriza-se pela existência de uma grande diferença hídrica nas estações do ano, onde a estação chuvosa é curta e muitas vezes sem um período definido. Este domínio ocupa cerca de 70% da região Nordeste do Brasil e compreende a uma área de aproximadamente 800.000 Km², a qual abrange o interior dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (PINHEIRO & ALVES, 2007; BENEVIDES *et al.*, 2007).

Em sua maior extensão a Caatinga é dominada por um clima semi-árido e fortemente sazonal, com alta concentração da estação chuvosa em apenas três meses, ocorrendo de forma muito irregular, seguida de longos períodos de seca, principalmente nas regiões mais centrais. A pluviosidade na região varia de 240 mm a 1.500 mm (LEAL *et al.*, 2005). Os solos no Domínio das Caatingas têm uma distribuição e formação muito variáveis e se distribuem em regiões de grande fertilidade – como a bacia sedimentar da Ibiapaba – e de baixa fertilidade, como na Chapada do Apodi; contudo, a Caatinga tem regiões de solos mais ricos que a Floresta Atlântica e o Cerrado, embora mais secos (VELLOSO *et al.*, 2002).

As regiões de caatinga semi-áridas apresentam características morfológicas típicas, de modo geral compreendendo superfícies pediplanadas, por vezes interrompidas por ocorrência de maciços e cristas residuais, planaltos e chapadas sedimentares, bem como bordejadas pela fímbria litorânea à retaguarda do Oceano Atlântico. Ainda se adicionam outras superfícies de relevo, como superfícies aplainadas, maciços e cristas residuais, campos de *inselbergs*, planaltos, chapadas sedimentares, planícies fluviais, faixas de praia, campos de dunas, falésias, entre outros (GUERRA *et al.*, 2009).

Do ponto de vista florístico a caatinga possui uma grande diversidade de espécies (*e.g.* PINHEIRO & ALVES, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2010), sendo a diversidade florística local determinada pelas diferenças nos fatores edáficos, como tipo de solo e capacidade de retenção de água (ALCOFORADO-FILHO *et al.*, 2003). O fator pluviosidade também pode ser limitante desta diversidade, como visualizado por Lemos & Rodal (2002). Estes estudos evidenciam que a flora arbórea de solos cristalinos se diferencia da flora de solos sedimentares. Entretanto, na flora herbácea, os fatores de solo, não influenciam significativamente no tipo de vegetação, exceto por algumas espécies, como *Encholirium spectabile* e algumas Cactaceae (SILVA *et al.*, 2009). Apesar desses estudos, Pinheiro *et al.* (2010) encontraram diferenças significativas em relação à flora herbácea em luvisolos.

Devido à complexidade de ambientes e à notável diversidade de flora, o domínio das Caatingas pode ser diferenciado com base em algumas fitofisionomias características, sendo dividido em oito ecorregiões (VELOSO *et al.* 2002) (Figura 5). A mais ocidental delas compreende o ‘Complexo de Campo Maior’, integralmente localizado no estado do Piauí, uma zona composta por solos sedimentares da formação Longá, que possui um nível de precipitação relativamente alto quando comparado com o restante da Caatinga, de modo que inundações periódicas são características. A vegetação predominante nessa área é característica de regiões de ecótono com o porte herbáceo dominante, compondo-se de uma mistura de elementos da Caatinga, da Floresta Atlântica e do Cerrado. Uma outra ecorregião é compartilhada entre os estados do Ceará, Pernambuco e Piauí é o complexo Ibiapaba-Araripe, um relevo altiplano com cerca de 700 m de altitude, sendo a região dominada por latossolos arenosos. A vegetação no topo é do tipo cerradão, com a presença de florestas pluviais nas encostas (VELOSO *et al.* 2002).

A Depressão Setentrional localizada nos estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Paraíba delimita-se com o complexo Ibiapaba-Araripe e Planalto da Borborema. Compreende a maior ecorregião da Caatinga e abrange a uma planície baixa, de solos rasos e

pedregosos, com origem cristalina e susceptíveis a erosões, com uma alta irregularidade pluviométrica. A vegetação é a mais característica da Caatinga, com elementos de porte arbustivo e arbóreo, porém de composição florística diferente da Depressão Meridional. O Planalto da Borborema é uma importante formação a leste do domínio das Caatingas, devido a um relevo de altitude que reduz a precipitação na depressão sertaneja. Compreende a uma formação granítica que se estende latitudinalmente entre os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas. São característicos dessa ecorregião os brejos de altitude, que compreendem *inselbergs* residuais classificados na Floresta Atlântica *sensu lato*, como regiões de grande diversidade florística, clima e solos diferenciados. A vegetação a barlavento é característica de zonas úmidas, na parte ocidental, predomina uma vegetação mais seca (VELOSO *et al.* 2002).

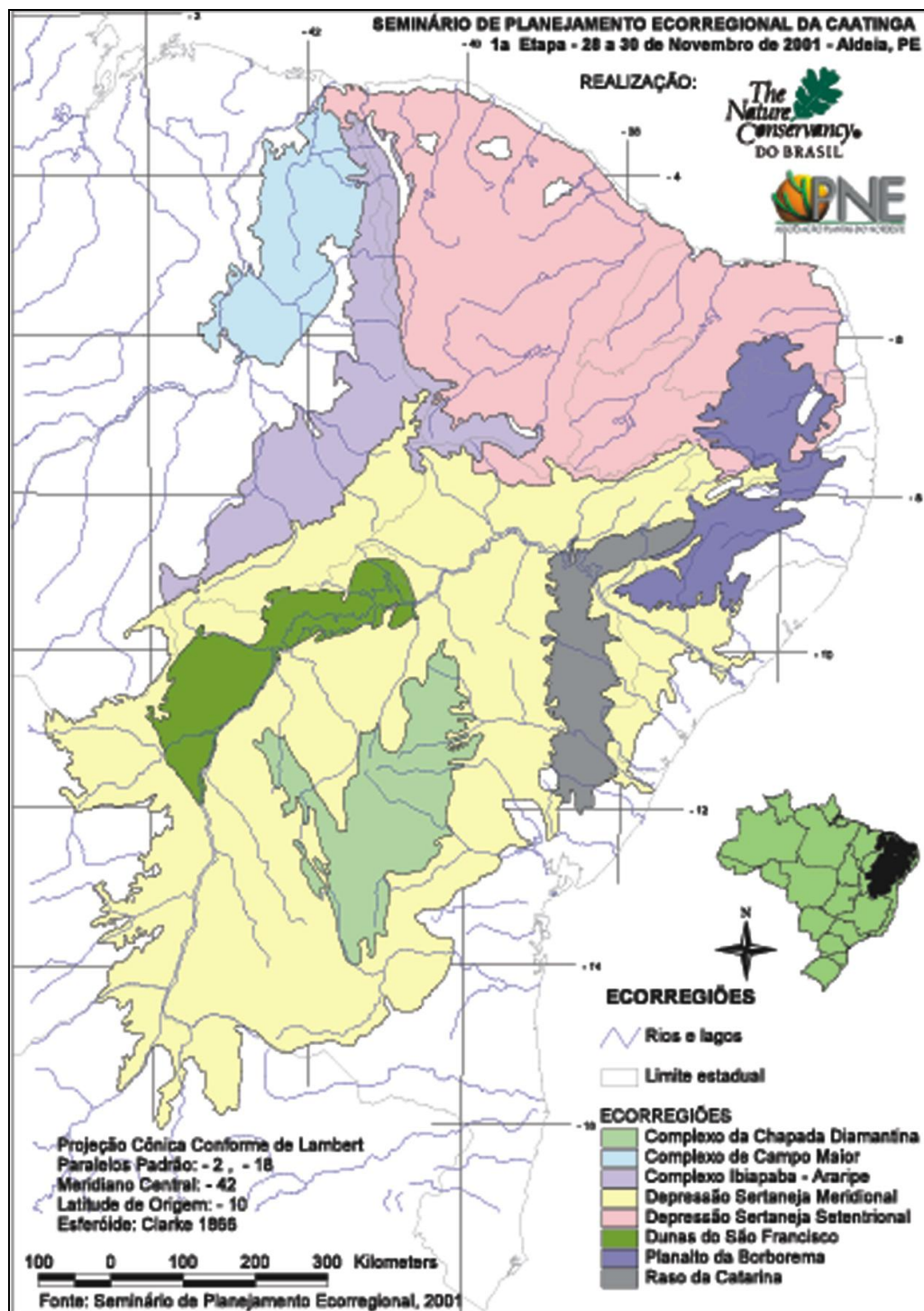


Figura 5. Ecorregiões da Caatinga propostas por Velloso *et al.* (2002).

A Depressão Sertaneja Meridional se estende como um mosaico entre os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, e se limita com o Cerrado mineiro com vegetação fitofisionomicamente semelhante à Depressão Sertaneja Setentrional. Ainda dentro da Depressão Sertaneja Meridional, mais três ecorregiões são reconhecidas: a do Complexo da

Chapada Diamantina, localizada no Estado da Bahia e em sua maioria formada por relevos acima de 500 m de altitude. Possui uma flora com altos índices de endemismo. Do ponto de vista geomorfológico e florístico, vários autores consideram a Chapada Diamantina como parte integrante do Complexo da Cadeia do Espinhaço (*e.g.*: VERSIEUX *et al.*, 2008). Outro domínio delimitado foi o Raso da Catarina, que compreende uma região bastante seca entre os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Tem como característica uma bacia sedimentar com uma pequena disponibilidade de água em sua superfície, exceto na área dos *canyons*. A última ecorregião é a das Dunas do São Francisco. Compreende formações arenosas de origem eólica, compostas por areias quartzosas de fertilidade muito baixa. A vegetação se agrupa em moitas arbustivas, ocorrendo também bromélias, como a macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex. Schult. f.) (VELOSO *et al.* 2002).

No que se refere a sua expansão e retração nos últimos máximos glaciais e períodos secos, a Caatinga parecer ter surgido por um mecanismo diferente daquele que originou a Floresta Tropical, enquanto as florestas sofreram retrações a vegetação seca se expandiu. Estes resultados têm sido reportados e corroborados com filogeografias em nível de espécie, como para *Plathymenia reticulata* Benth e nos sapos do gênero *Rhinella* (NOVAES *et al.*, 2010; THOME *et al.*, 2010). Entretanto, matas de galeria se expandiram quando as condições climáticas não eram adequadas para as floras locais, sendo estas responsáveis pela ligação entre a Floresta Atlântica e Amazônica. (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

No período Pleistocênico houve uma redução na temperatura global registrada em diversos ambientes do continente sul americano, onde as floras mais adaptadas a climas frios se sobrepuseram sobre a flora xérica e de florestas. Por exemplo, há registros de que as araucárias aumentaram sua abrangência para regiões hoje de domínio morfoclimático dos Cerrados. Estudos suportam ainda que no período Holocênico as florestas tropicais apresentaram uma maior abrangência do que seria esperado para os dias atuais –suposições baseadas na presença de fósseis de animais de floresta na região da Chapada Diamantina, domínio das Caatingas. No final desse período a vegetação ainda era florestal; entretanto, são registradas plantas com adaptações xéricas para o mesmo período. Em escala cronológica o período seguinte é caracterizado por um clima seco e vegetação xerófita, com uma relevante redução nas precipitações na região central do Brasil. Em seguida períodos de oscilação foram registrados, porém em níveis muito baixos. Após essa ocasião os registros são semelhantes às condições atuais (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

2.2 *Inselbergs* – Um Modelo de Ilhas Terrestres

Inselbergs são afloramentos rochosos cristalinos encontrados em regiões tropicais e subtropicais, sendo bastante diferenciados. Dadas suas características microclimáticas, essas regiões apresentam uma fauna e flora bem adaptada. O termo “*inselbergs*” foi introduzido pelo geólogo Bornhardt ao se referir às montanhas monolíticas ou grupos de montanhas que surgem abruptamente em um terreno plano. A vegetação dos *inselbergs* difere daquela que a circunda devido a fatores edáficos e microclimáticos, que formam um conjunto de características específicas para alguns grupos de plantas adaptadas; sendo esses ambientes considerados centros de diversificação para alguns grupos de plantas como as Bromeliaceae, Cactaceae e Velloziaceae (POREMBSKI *et al.*, 1998). Contudo, essas formações são tratadas, do ponto de vista ecológico, como ilhas de vegetação terrestre (POREMBSKI, 2007).

No tocante a fatores edafoclimáticos, os *inselbergs* são tratados como pequenos desertos microclimáticos, com registro de altas temperaturas, principalmente sobre a rocha. Os solos, de um modo geral, são pobres e variam sazonalmente. Por isso a flora desses sítios é altamente adaptada e diferenciada da flora circundante. Também estão presentes nesse tipo de vegetação algumas espécies de cianobactérias, briófitas e várias plantas vasculares, principalmente monocotiledôneas (POREMBSKI, 2007).

No Brasil algumas regiões de Floresta Atlântica abrigam *inselbergs*, que se assemelham em sua composição florística às regiões de campos rupestres do Brasil central, que compreende principalmente a formação da Cadeia do Espinhaço, compartilhando inclusive algumas espécies, como dos gêneros *Encholirium*, *Trileps* e *Vellozia*. A cadeia do espinhaço tem sido um importante centro de diversidade e irradiação desses grupos de espécies (POREMBSKI *et al.*, 1998; VERSIEUX *et al.*, 2008).

Uma das principais características visíveis nas plantas de *inselbergs* é a propagação vegetativa, que foi tratada como característica importante para o sucesso evolutivo de vegetais rupícolas, o que no entanto foi refutado com estudos moleculares, onde indivíduos apresentavam uma grande variação genética intrapopulacional. Este tipo de reprodução apresenta vantagens nesses ambientes por necessitar apenas de uma única colonização para que grandes populações possam se estabelecer em uma determinada localidade. Por outro lado, a reprodução sexual pode ser um risco, pois o recrutamento de novos indivíduos via sementes pode apresentar grande mortalidade de indivíduos novos face às condições ambientais severas (POREMBSKI *et al.*, 1998; CAVALLARI *et al.*, 2006;

BARBARÁ *et al.*, 2007, 2008, 2009; PALMA-SILVA, 2011). O estabelecimento de novos espécimes nesse tipo de formação está associado com o relevo e a capacidade de retenção de nutrientes, de modo que a maioria das plantas tende a colonizar solos mais pedregosos, fissuras e canaletas (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Em relação às estratégias que esses vegetais apresentam para esses ambientes, a suculência, ou estruturas anatômicas capazes de prover reservas de água para suportar a limitação hídrica, são comuns. Algumas possuem a estratégia de estarem presentes apenas no período chuvoso, mantendo um banco de sementes na estação seca (POREMBSKI *et al.*, 1998; GOMES & ALVES, 2009). Em um modelo australiano, o banco de sementes tem sido tratado como uma característica essencial em plantas de *inselbergs*, mas apenas até que a reprodução vegetativa possa ocorrer, uma vez que a maioria das plantas apresentou esse tipo de estratégia (HUNTER, 2003). Em *inselbergs* sul-americanos ambas as estratégias reprodutivas são reportadas como eficientes na manutenção da flora (SCARANO, 2007).

Em *inselbergs* da Caatinga, *E. spectabile* é uma espécie que visualmente caracteriza esse tipo de área, formando ilhas de vegetação, muitas vezes por reprodução vegetativa, especialmente na zona até os 800 m de altitude. A distribuição de espécies nas ilhas de vegetação está associada a características como tamanho da ilha, textura do solo, pH, profundidade e matéria orgânica acumulada. Quanto à similaridade, os estudos mostram que a distância geográfica está diretamente relacionada com a composição florística de cada afloramento, porém a flora é bastante diferente da circundante (GOMES & ALVES, 2009). No que se refere à diferenciação da flora circundante este padrão também é observado para *inselbergs* de Floresta Atlântica e Amazônica. Porém, no que se refere a afloramentos da Guiana Francesa, a similaridade entre os afloramentos é menor (POREMBSKI *et al.*, 1998; SARTHOU & VILLERS, 1998).

A similaridade florística de *inselbergs* da Caatinga pode estar associada ao clima predominante em cada área, bem como ao nível de atividade antrópica em cada afloramento, o que pode resultar em semelhanças entre as floras dessas formações, tratando-se de um dado alarmante, visto que esses sítios têm sido alvo de extração de rochas para a pavimentação de ruas (FRANÇA *et al.*, 1997; PORTO *et al.*, 2008).

Em comparações acerca da correlação entre as variáveis similaridade florística, similaridade ecológica e proximidade filogenética em *inselbergs* florestais, a similaridade florística aumenta quando a distância ecológica diminui, de modo que a influência do gradiente ecológico em relação à similaridade florística é maior que a distância geográfica.

Entretanto, o agrupamento filogenético está mais relacionado à similaridade ecológica que à distância geográfica (PARMENTIER & HARDY, 2009). Em nível global, alguns grupos de *inselbergs* são visualizáveis no que diz respeito à similaridade florística, sendo encontradas diferenças entre *inselbergs* sul-americanos, africanos, de Madagascar e Australianos (POREMBSKI, 2007).

Em afloramentos da região a norte da Cadeia do Espinhaço, que correspondea Chapada Diamantina, não existem registros de *E. spectabile*, embora existam espécies de Bromeliaceae (como *Hohenbergia catingae* Ule) que dominam a paisagem (CONCEIÇÃO & GIULIETTI, 2002; CONCEICAO *et al.*, 2007).

3. Genética da Conservação e Delimitação de Espécies

Na idade média a população europeia era em torno de 20 milhões de habitantes, um valor encontrado hoje em algumas grandes metrópoles mundiais, como Nova Iorque. O desenvolvimento de novas tecnologias para aumentar a produção de alimentos nos últimos 500 anos, aliado à expansão das fronteiras agrícolas sobre a flora natural, gerou perdas incalculáveis para a biodiversidade, através extinção de espécies que nem chegaram a ser conhecidas. A taxa de extinção de espécies pode ser comparada com outras cinco grandes extinções em massa que ocorreram no planeta em tempos geológicos passados, o que levou conservacionistas a argumentar que atualmente estamos presenciando uma sexta extinção (FRANKHAM *et al.*, 2002).

Os avanços na genética e na tecnologia de DNA levaram a ciência a utilizar-se de análises e correlacioná-las com fatores ecológicos, de modo que novos métodos para estudo da diversidade genética vêm sendo aplicados, seja no campo de marcadores moleculares, seja em análises estatísticas ou nos softwares de análise (JEHLE & ARNTZEN, 2002; PEARSE & CRANDALL, 2004). Algumas características ecológicas têm sido correlacionadas com efeitos genéticos, tais como: depressão endogâmica, acúmulo de genes deletérios, perda de variação em populações pequenas, sucesso da reintrodução e manejo de espécies, depressão exogâmica, fragmentação, incertezas taxonômicas e migração (FRANKHAM, 1995).

O estudo dos níveis de diversidade e estrutura genética é essencial para todas as inferências relacionadas à Genética da Conservação. Os níveis de variação genética em uma espécie representam o balanço entre mutação, fluxo gênico, deriva e seleção natural. A variação genética é gerada por mutação e perdida por deriva genética devido a um tamanho

finito das populações. A seleção natural pode ainda erodir a variação genética por fixar alelos ou promover a sua retenção como um resultado de seleção diversificadora (FRANKHAM, 1996).

Como exemplo, os efeitos da fragmentação de habitat geram altos índices de endocruzamentos que podem interferir diretamente nos níveis de diversidade genética de cada população. De fato a depressão endogâmica depende de outros fatores, como o tamanho efetivo populacional, mas como um todo, a fragmentação e o isolamento tendem a reduzir o fluxo gênico entre os indivíduos constituintes das populações (FISCHER *et al.*, 2000). Populações reduzidas e isoladas são mais vulneráveis a perturbações ambientais externas podendo resultar na redução do sucesso reprodutivo, o que pode contribuir para a fixação de mutações deletérias com um possível efeito demográfico. Este fator torna-se mais evidente em pequenas populações, porque nessas as mutações deletérias tendem a não ser selecionadas naturalmente, sendo fixadas por deriva genética. Desta forma, geralmente a diversidade genética tende a reduzir nessas populações, principalmente pelo fato de que os cruzamentos em sua maioria não são aleatórios, existindo, além disso, a possibilidade de predominância da autogamia ou de reprodução vegetativa como principais vias de formação de descendentes (KELLER & WALLER, 2002).

As espécies são consideradas fundamentais para a ecologia, evolução, sistemática e biologia da conservação. Seu conceito tem sido tratado por diversos pesquisadores desde meados do século XX, sendo sua definição muitas vezes atrelada a um dado espaço de tempo evolutivo. Além disso, são tratadas como unidades temporais ou como segmentos de linhagens evolutivas em nível populacional (SITES & MARSHALL, 2004).

Definir e delimitar uma espécie é de importância crucial para a biologia da conservação e para a definição de suas estratégias de manejo. Desta forma pode-se evitar que a mesma seja extinta, permitindo que híbridos sejam identificados e protegidos, impedindo que espécies identificadas incorretamente sejam hibridizadas com outras espécies e garantindo que populações potenciais para o manejo não sejam esquecidas (FRANKHAM *et al.*, 2002). Isto se contrasta com o que se conhece por “extinção formal de espécies”, onde binômios são sinonimizados e espécies são tratadas como outras semelhantes (LEME, 2003). No entanto, vários casos que não se adéquam a nenhuma dessas situações são identificados, como em espécies anel (*ring species*) que compreendem populações cuja reprodução só é possível com indivíduos adjacentes porque existe uma barreira reprodutiva entre os mais

distantes geograficamente o que reflete a existência de eventos micro-evolutivos (PEREIRA *et al.*, 2011).

Outro aspecto importante para o manejo na biologia da conservação é a possibilidade de depressão exogâmica, que ocorre entre espécies aparentadas, normalmente com diferenças cromossômicas fixadas ou que não trocam genes há cerca de 500 anos (FRANKHAM *et al.*, 2011). A troca entre genes de espécies diferentes não aparenta ser um fator preponderante para a manutenção de uma espécie, como no caso das *Pitcairinia staminea* Lodd. e *P. albiflos* Herb., onde a introgressão de genes de *P. staminea* em *P. albiflos* e hibridização entre as duas ocorre em populações naturais (PALMA-SILVA *et al.*, 2011), evento que provavelmente ajuda a manter a diversidade genética em *P. albiflos*, já que esta apresenta uma distribuição restrita e baixa diversidade genética quando estudada isoladamente (DOMINGUES *et al.*, 2011). O fluxo gênico intra e interespecífico entre espécies relacionadas é um elemento importante para que ocorra ou não introgressão entre as espécies. Normalmente quando o fluxo intraespecífico é alto, o interespecífico é quase nulo, no entanto quando o inverso ocorre, há mais possibilidades de que o fluxo interespecífico e introgressão entre espécies relacionadas (PETIT & EXCOFFIER, 2009). Tal situação foi identificada inclusive para espécies de coníferas ocorrentes na China (DU *et al.*, 2009, ZHOU *et al.*, 2010). Espécies de *Helianthus* sp. também apresentaram introgressão em genes nucleares mostrando padrões não geográficos na distribuição de espécies (KANE *et al.*, 2009).

Estudos de genética de populações associados a marcadores genéticos têm sido utilizados para o auxílio e delimitação de espécies em complexos específicos, como na análise feita com *Lupinus albifrons* Benth. (Fabaceae), um complexo específico onde várias subespécies e variedades são relacionadas a partir de haplótipos cloroplastidiais. O estudo apontou para incongruências entre a evolução dos haplótipos e a distribuição geográfica da espécie, o que corresponderia a uma evolução reticulada, sugerindo-se que marcadores cloroplastidiais podem mascarar os resultados de associação entre indivíduos aparentados (HUANG & FRIAR, 2011).

4. Marcadores Moleculares e Genética de Populações em Bromeliaceae

4.1 Principais Marcadores Utilizados em Genética de Populações

A diversidade genética é requerida para a adaptação das populações em relação às mudanças ambientais, tendo sua manutenção um papel central na conservação biológica. Esta variação pode ser detectada por diversos tipos de marcadores moleculares derivados do DNA genômico, de cloroplastos, de sequências mitocondriais, ou até de polimorfismos protéicos (FRANKHAM *et al.* 2002). Os níveis de diversidade genética são o reflexo de um balanço entre taxas de mutação, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (FRANKHAM, 1996).

Para a escolha do marcador molecular, devem-se levar em consideração seus níveis de reprodutibilidade, custos e tipo de herança (NYBOM, 2004). Por exemplo, em estudos populacionais marcadores codominantes (como isoenzimas e microssatélites) podem inferir quanto à diversidade genética e diferenças de heterozigosidade permitindo estimar as frequências em gerações futuras. Os marcadores dominantes (como DAF (*DNA Amplification fingerprinting* – Impressão Genômica de DNA), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Amplificação Randômica de DNA Polimórfico), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* – Sequências Intercaladas a Repetições Simples) não permitem abordagem em relação à heterozigosidade, embora sejam bastante eficientes quando utilizados para estimativas de índices de diversidade genética principalmente associados a análises populacionais. Além disso, sua aplicação é possível mesmo sem conhecimento genético prévio sobre o genoma de uma dada espécie (NYBOM, 2004).

4.1.1. Marcadores Dominantes

O emprego de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética tem sido crescente. Tal abordagem teve seu início na metade do século XX com o uso de isoenzimas (CAVALLI, 2003). Em diversos estudos foram utilizadas isoenzimas em abordagens populacionais. No entanto, ao longo dos anos seu uso tem diminuído devido à necessidade de grande quantidade de material para a geração dos marcadores e à baixa reprodutibilidade. A redução do uso deste marcador foi impulsionada pelo aumento do interesse pelos marcadores de DNA (NYBON, 2004; SCHLÖTERER, 2004).

Facilidade de uso e reprodutibilidade são dois importantes parâmetros sugeridos ao escolher marcadores moleculares de DNA para um estudo populacional (BORNET & BRANCHARD, 2001). Além destas características, os marcadores dominantes destacam-se principalmente por não requerem informações sobre as sequências do genoma das espécies a serem analisadas, como ocorre com maioria das espécies nativas neotropicais (NYBOM & BARTISH, 2000). Dentre os marcadores dominantes, um bastante conhecido e aplicado em estudos populacionais é o RAPD. Utilizado desde 1996, este marcador pode produzir um bom número de bandas polimórficas, detectando mutações com eficiência além de variações genéticas interpopulacionais (BARTISH *et al.*, 1998; CAVALLI, 2003). Como vantagem o RAPD é considerado menos tendencioso a erros quando se trata de análise de diversidade genética, por levar em consideração diferenças genéticas mais sutis entre espécimes, não detectáveis em nível de enzimas, apresentando assim resposta mais eficiente, por exemplo, sob parâmetros de diversidade genética intrapopulacional (FISCHER & MATTHIES, 1998).

Dentro da gama de marcadores atualmente disponíveis, podem ser destacados dois outros marcadores dominantes: DAF e ISSR principalmente por serem bastante eficientes na geração de locos polimórficos auxiliando especialmente em estudos de diversidade genética. Quanto ao tipo de DNA alvo, o DAF amplifica DNA genômico através de *primers* de sequência arbitrária, enquanto o ISSR vale-se de *primers* de sequências repetidas em tandem amplificando sequências entre regiões de microssatélites (LACERDA *et al.*, 2002). As marcas produzidas por ambos os marcadores são separadas por eletroforese, sendo analisadas com base na presença e ausência de bandas em um determinado peso molecular (SCHLÖTERER, 2004).

Marcadores ISSR, disponíveis desde 1994, baseiam-se na amplificação com *primers* semi-arbitrários de sequências repetidas em tandem, abundantes em plantas. Essa técnica é bem consistente; no entanto, a temperatura de pareamento dos *primers* ao DNA alvo deve ser específica, pois estes são bastante sensíveis e se incorretas podem gerar pareamentos inespecíficos (BORNET & BRANCHARD, 2001). Apesar de ser reconhecido como menos polimórfico em relação à grande maioria dos marcadores dominantes, a técnica evita problemas que os alelos nulos em microssatélites comumente trazem para as análises (SOUZA *et al.*, 2008). Adicionalmente, este marcador tem boa reprodutibilidade em comparação com aqueles baseados em *primers* aleatórios como o RAPD (WOLFE & LISTON, 1998).

Bornet e Branchard (2001) realizaram testes de reprodutibilidade em reações de ISSR utilizando três termocicladores diferentes e verificaram que o padrão de bandas foi o mesmo nos três aparelhos, de modo que o uso de máquinas de fabricantes diferentes não interferiu no padrão de amplificação. Outro fator positivo destacado por esses autores foi que o ISSR requer pouca

infra-estrutura em termos de equipamentos de laboratório para execução dos experimentos tornando sua aplicabilidade facilitada.

Por sua vez, o marcador DAF (*DNA Amplification Fingerprinting* – Impressão Genômica de DNA) foi desenvolvido concomitantemente ao RAPD por grupos de pesquisa diferentes, embora ambos marcadores apresentem uma base técnica equivalente. Apesar disso, existe uma diferença fundamental entre estes, uma vez que o DAF baseia-se no uso de maiores concentrações de *primers* e menores concentrações de DNA molde em relação ao RAPD, aumentando a estringência da reação, favorecendo a reprodutibilidade e a obtenção de uma maior quantidade de marcas polimórficas. Além disso, a reação de DAF vale-se de um único primer cujo tamanho pode variar de 8 a 18 nucleotídeos, podendo usar também primers em grampos (mini-hairpins).

Ainda sobre as características e qualidades do DAF, estudos realizados quanto à eficiência dos *primers* mostram que os seis primeiros nucleotídeos do *primer* são os mais importantes para o pareamento, e que um aumento no número de nucleotídeos destes *primers* não altera a reprodutibilidade da técnica, mas reduzem a probabilidade do pareamento correto da região 5' (CAETANO-ANOLLÉS & BASAM, 1993).

Marcadores moleculares dominantes têm sido utilizados para estudos de caracterização da estrutura genética em diversos grupos de Bromeliaceae (*e.g.* SGORBATI *et al.*, 2004; CAVALLARI *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2009; DOMINGUES *et al.*, 2011), bem como em estudos de genômica de populações para a identificação de loci que sofrem seleção (*outliers*), devido à sua abrangência em amplificar várias regiões do DNA. Apesar de sua grande utilização, sua aplicação ainda apresenta controvérsias em análises de nível estatístico por sua limitação em poucos graus de liberdade (BUTLIN, 2010; BUERKLE *et al.*, 2011).

4.1.2. Marcadores Codominantes

Outra classe de marcadores bastante aplicados em estudos populacionais são os STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites* – Sequências agrupadas em sítios de Microssatélites) bem como sua variação, o SSR (*Simple Sequence Repeats* – Repetições de Sequências Simples). Estes marcadores são específicos por parear em regiões flangeadoras de sequências curtas repetidas em *tandem* com comprimento de um a seis nucleotídeos. Como cada loco é estudado separadamente, sendo possível verificar diferenças entre homozigotos e heterozigotos, tais marcadores permitem uma abordagem codominante. Microssatélites adicionalmente são multialélicos e normalmente apresentam alta heterozigosidade (NYBON,

2004; LIMA, 2007). Portanto, é considerado um bom indicador para o estudo dos parâmetros de genética populacional, padrões de fluxo gênico e de grau de parentesco, devido à distribuição de suas sequências ao longo dos genomas de plantas (ZUCCHI, 2007).

Microssatélites são formados por sequências de um a seis motivos repetidos em tandem em sua maioria localizadas em regiões não codificantes, sendo de um modo geral considerado o melhor marcador neutro. Quanto à sua estrutura, essas sequências são presentes em repetições de di e tri-nucleotídeos localizadas em regiões codificantes, e repetições maiores em regiões não codificantes (LI *et al.*, 2002). Algumas delas não são tão instáveis, como o motivo CAG, que normalmente são desestabilizadas durante a meiose ou gametogênese, de modo que a sequência é pouco encontrada em microssatélites (JANKOWSKI *et al.*, 2000). Os níveis de substituição tanto para inserção como para a deleção de um único nucleotídeo tem a mesma probabilidade de ocorrer, de modo notório em regiões não codificantes as quais apresentam aparentemente maior susceptibilidade a mutações. A neutralidade dos SSR vem sendo questionada quando são verificadas diferenças em tamanho entre procariotos e eucariotos, o que sugere que esse tipo de sequência promove vantagens adaptativas a mudanças bruscas de ambientes, observando-se também semelhanças entre táxons próximos permitindo o uso de *primers* de uma espécie em outra (LI *et al.*, 2002).

De um modo geral estudos têm evidenciado que os SSR têm funções na organização da cromatina, podendo formar alças e ganchos que influenciam na organização cromossômica e estrutura do DNA, estando fortemente relacionados com a organização dos centrômeros e telômeros. Funções na regulação no processo metabólico do DNA também são verificadas, especialmente na replicação, recombinação do DNA e ciclo celular. Os SSR ainda podem ter funções reguladoras de genes, influenciando, por exemplo, a transcrição gênica (LI *et al.*, 2002).

Além desses, marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de um único nucleotídeo) também são bastante informativos em estudos filogeográficos, visto que muitos são multialélicos, apresentando baixas taxas de mutação, comparáveis ao mtDNA, embora sua utilização ainda seja pequena, em vista dos altos custos de sequenciamento em níveis populacionais (BRUMFIELD *et al.*, 2004).

4.1.3. Estudos de Genética de Populações em Bromeliaceae

As Bromeliaceae em seus ambientes nativos têm sido estudadas em diferentes níveis populacionais, com diferentes marcadores e visando adquirir informações acerca de eventos geográficos e biológicos (Tabela 3). Os estudos seguiram a evolução dos marcadores moleculares, sendo as aloenzimas as primeiras a serem aplicadas. A relação epífito-forófito foi alvo de um estudo deste tipo. A espécie *Tillandsia achyrostachis* Moor ex Baker é dependente de um forófito específico bastante explorado no México, árvores estas bastante exploradas pela população local. Para averiguar esse impacto, 16 *loci* de aloenzimas foram identificados, sendo observada uma heterozigosidade de 0,127. A espécie apresentou um alto nível de endocruzamento ($F_{is}=0,43$) e de fluxo gênico histórico entre as populações foi baixo ($N_m=0,46$). A partir desses valores tem-se proposto que a perda de habitat e a fragmentação foram responsáveis pela perda de diversidade observada. A reprodução vegetativa deve exercer influências na estrutura genética da espécie, que aparenta ter uma carência de heterozigotos. A estrutura apresentada e o baixo nível de fluxo gênico denotam ainda a dependência da *T. achyrostachis* por seu forófito, o que sugere a melhor conservação do habitat da espécie e manejo controlado das árvores hospedeiras para que a manutenção da espécie seja possível na área (GONZALES-ASTORGA *et al.*, 2004).

Plantas com distribuição restrita também foram avaliadas, como *Aechmea tuitensis* Mangaña ex. Lott, uma espécie epilítica endêmica do México, analisada por marcadores aloenzimas. Nove populações foram amostradas e nove *loci* encontrados, dos quais oito eram polimórficos. A diversidade genética para essa espécie foi relativamente mais alta do que se tem observado para populações restritas, observando-se uma heterozigosidade de 0,14, sendo que em algumas subpopulações verificou-se a existência de excesso de heterozigotos. O nível de clones na espécie também foi amostrado, ficando evidente que *A. tuitensis* mantinha clones na população, o que parecer ser uma estratégia de sobrevivência em afloramentos rochosos, pois a manutenção dos clones por um longo período de tempo garante o *pool* gênico em diversidade suficiente para manter a espécie, mesmo com um tamanho populacional efetivo pequeno (IZQUIERDO & PIÑERO, 2000).

Nos Andes a espécie *Puya raimondii* Harms, a maior planta entre as bromeliáceas, tem uma distribuição espaçada em sítios no Peru e Bolívia, sendo fortemente ameaçada de extinção. Oito populações foram analisadas com marcadores AFLP, apresentando-se de um modo geral bastante polimórficos quando comparados aos marcadores cpSSR e às progênies

estudadas com o marcador RAPD (SGORBATI *et al.*, 2004). Marcadores AFLP apontaram para níveis baixíssimos de diversidade genética em todos os parâmetros estimados, enquanto marcadores de cpSRR não apresentaram nenhum polimorfismo, de modo que baixos níveis de similaridade genética entre as localidades foram encontrados, o que reforçou ainda mais a ameaça de extinção da espécie. Uma estratégia de reprodução por endocruzamento foi indicada para justificar a baixa diversidade genética observada na geração F1. Apesar de boa produção de sementes, germinabilidade e distribuição geográfica de *P. raimondii*, a espécie está em grande risco de extinção por predação e perda de habitat (SGORBATI *et al.*, 2004).

Espécies de curta distribuição também foram estudadas por marcadores RAPD, onde cinco *primers* polimórficos foram aplicados em populações de *Encholirium biflorum*, *E. pedicellatum* e a espécie *E. subsecundum* de distribuição mais ampla. Um número de 58, 59 e 60 marcas polimórficas foram encontradas respectivamente nas espécies. As espécies mais restritas (*E. biflorum* e *E. pedicellatum*) apresentaram níveis de heterozigosidade mais baixos que *E. subsecundum*. Os táxons apresentaram F_{st} de 0,14, 0,08 e 0,16 respectivamente, denotando pouca estruturação genética entre as populações. A reprodução vegetativa, esperada para essas espécies, aparentou ter baixa frequência, uma vez que os perfis de RAPD indicaram alta heterozigosidade em populações pequenas (CAVALLARI *et al.*, 2006).

Os *inselbergs*, que por sua estruturação apresentam espécies com distribuição restrita, sendo essas também alvo de estudos que visaram a geração de informações para a conservação, como em *Pitcairnia albiflos*, endêmica de afloramentos rochosos do Rio de Janeiro. Análises com o marcador RAPD foram conduzidas, sendo que 33 *primers* polimórficos geraram 88 bandas. Como a distribuição da espécie é restrita, ocorrendo em apenas três *inselbergs* muito próximos geograficamente, observaram-se níveis de diversidade genética baixos, embora clones não tenham sido detectados na população. Houve uma ausência de fluxo gênico efetivo, de modo que as populações tendem à estruturação, como evidenciado pela Análise Molecular de Variância (AMOVA). Como conclusões o estudo sugeriu a inclusão da espécie na lista vermelha da flora brasileira (DOMINGUES *et al.*, 2011).

Tabela 3 – Estudos de genética de populações em Bromeliaceae

Artigo	Espécies alvo	Marcador	Ambiente
Izquierdo & Piñero, 2000	<i>Aechmea tuitensis</i>	8 loci de aloenzimas	Afloramentos rochosos
Sarthou et al., 2001	<i>Pitcairnia geyskesii</i>	8 loci de aloenzimas	Afloramentos graníticos
Gonzales- Astorga et al., 2004	<i>Tillandsia achyrostachys</i>	16 aloenzimas	Florestas mexicanas
Sgorbati et al., 2004	<i>Puya raimondii</i>	AFLP	Região andina
Cavallari et al., 2006	<i>Encholirium spp.</i>	RAPD	Campos rupestres
Barbará et al., 2007	<i>Alcantarea spp.</i>	SSR	Afloramentos graníticos
Barbará et al., 2008	<i>Alcantarea spp.</i>	SSR	Afloramentos graníticos
Barbará et al., 2009	<i>Alcantarea spp.</i>	SSR	Afloramentos graníticos
Palma-Silva et al., 2009	<i>Vriesea gigantea</i>	SSR e cpSSR	Floresta Atlântica
Bosselier-Dubayle et al., 2010	<i>Pitcairnia geyskesii</i>	SSR	Afloramentos graníticos
Domingues et al., 2011	<i>Pitcairnia albiflos</i>	RAPD	Afloramentos graníticos
Zanella et al., 2011	<i>Bromelia antiachanta</i>	SSR	Floresta Atlântica
Palma-Silva et al., 2011	<i>Pitcairnia spp.</i>	SSR e cpSSR	Afloramentos graníticos

Dentre os gêneros ocorrentes em *inselbergs*, *Alcantarea* tem sido usada como modelo de estudos da proximidade genética entre populações de *inselbergs* com marcadores SSR, especialmente na Floresta Atlântica. Em relação à coesão das espécies, *A. imperialis* possui distribuição mais ampla e apresenta níveis de fluxo gênico baixos, de modo que as populações podem ser alvo da deriva genética. Por sua vez, *A. geniculata* Wawra apresenta fluxo gênico suficiente para manter a coesão das populações. O padrão de coesão entre as populações de *A. imperialis* Harms mostrou-se semelhante ao observável para animais em “ilhas celestes”, que correspondem a sítios de altitude em cordilheiras norte-americanas. Padrões de reprodução e de distância geográfica parecem ter sido responsáveis pelos níveis de fluxo gênico e estrutura genética nessas duas espécies (BARBARÁ *et al.*, 2007).

Em estudos seguintes com os mesmos marcadores, outras duas espécies de *Alcantarea* restritas a afloramentos costeiros foram adicionadas (*A. glaziouana* Leme e *A. Regina* Harms), sendo estas estudadas do ponto de vista das relações da estrutura genética e estratégias reprodutivas. Neste contexto, espécies de grandes altitudes (*A. imperialis* e *A. geniculata*) apresentaram estrutura genética de plantas alógamas, ao passo que as de baixa altitude (*A. glaziouana* e *A. regina*) apresentaram estruturas de espécies autógamas (BARBARÁ *et al.*, 2009).

A reprodução vegetativa também foi alvo de estudos do ponto de vista molecular, com marcadores SSR e as mesmas espécies do estudo de Barbará *et al.* (2008, 2009) envolvendo a estrutura intrapopulacional, com reprodução clonal e reprodução por autogamia. Os dados indicaram que a estrutura genética intrapopulacional observada deve ser fruto de cruzamento entre parentes próximos, hipótese considerada mais provável que a anterior de autocruzamentos (BARBARÁ *et al.*, 2008).

Inselbergs da Guiana Francesa representam localidades que, diferentemente da floresta tropical que as circundam, tem uma história de fragmentação diferenciada, sendo vistos como ilhas terrestres funcionais, o que levaria espécies a terem padrões genéticos diferenciados. Oito marcas aloenzimáticas foram utilizadas em *Pitcairnia geyskesii* L. B. Sm., endêmica de *inselbergs* da região, visando à caracterização genética da espécie. A heterozigosidade média foi de 0,188, considerada alta em relação às outras Bromeliaceae com histórias de vida semelhantes. Foram encontrados altos níveis de diferenciação interpoblacional ($F_{st}=0,322$), onde *inselbergs* mais próximos compartilharam uma maior quantidade de alelos, de modo que houve correlação direta entre distância geográfica e distância genética, o que reflete um

isolamento das populações devido a distância entre as populações refutando o modelo de ilhas proposto (SARTHOU *et al.*, 2001).

A mesma espécie (*P. geiskesii*) que apresenta ampla distribuição na Guiana Francesa, com uma disjunção Norte-Sul foi testada do ponto de vista histórico e genético-populacional com marcadores SSR, considerando o histórico de possíveis refúgios florestais durante a retração das formações tropicais do Pleistoceno. Existem duas hipóteses acerca da retração da espécie, sendo que uma considera a existência de um lote contínuo florestal central no território que hoje é a Guiana Francesa, enquanto outra propõe a ocorrência de duas formações florestais vicariantes. Semelhanças genéticas entre afloramentos atualmente separados por florestas sugerem uma ligação histórica entre as populações da bromélia, sugerindo uma ligação entre floras adaptadas a ambientes xéricos, refutando a idéia de um único bloco florestal contínuo. O estudo ainda revelou que *P. geiskesii* colonizou o ambiente da Guiana Francesa a partir das populações do Norte, seu provável centro de origem, tendo aumentado sua abrangência por um processo de colonização passo a passo (*stepping-stones*) (BOSSÉLIER-DUBAYLE, *et al.*, 2010).

A identificação de refúgios pleistocênicos também foi verificada com a espécie *Vriesea gigantea* Mez, de distribuição Norte-Sul na floresta atlântica brasileira. Essa espécie foi analisada com marcadores SSR nucleares e cloroplastidiais, revelando que haplótipos cloroplastidiais possuíam maior diversidade em áreas próximas a regiões de maior probabilidade de existência de refúgios florestais no período pleistocênico. A espécie apresentou ainda um padrão onde as populações marginais apresentavam níveis de diversidade diferenciados por possuírem uma maior diversidade de haplótipos. Pelo padrão apresentado pelos SSR nucleares, foi possível inferir que a colonização de novos ambientes pela espécie seguiu um padrão Norte-Sul (PALMA-SILVA *et al.*, 2009).

Apesar de grande conservação no número cromossômico, as Bromeliaceae apresentam alguns poliplóides (GITAÍ *et al.*, 2005). *Bromelia antiachanta* Bertoloni, uma espécie tetraplóide foi estudada no Sul do Brasil com os marcadores SSR. A espécie já era conhecida por ser tetraplóide, porém não é claro se alopoliplóide ou autopoliplóide. O padrão de bandas polissômico mostra que a espécie teria uma origem autotetraplóide, porém sua meiose já estaria estabilizada, dado que as sementes são viáveis. A estrutura genética da espécie apresentou altos índices de endocruzamentos (Fit), sugerindo que a reprodução clonal seja frequente (ZANELLA *et al.*, 2011).

A associação de Bromeliaceae com *Inselbergs* foi recentemente estudada no Rio de Janeiro, onde quatro espécies de *Pitcairnia* (*P. flammea* Lndl., *P. albiflos*, *P. corcovadensis* Wawra e *P. staminea*) apresentaram aspectos interessantes na coesão de espécies. Um compartilhamento de haplótipos e hibridização foram identificados entre *P. staminea* e a endêmica *P. albiflos*, sugerindo que a introgressão de genes seria um importante fator na especiação em ambientes como os *inselbergs* (PALMA-SILVA *et al.*, 2011).

5. Referências Bibliográficas

- ALCOFORADO-FILHO, F. G.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RODAL, M. J. N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa arbórea em caruaru, Pernambuco. *Acta Botanica Brasilica*, v. 17, 2, p. 287 –303, 2003.
- APGIII. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 161, p. 105 – 121, 2009.
- BARBARÁ, T.; LEXER, C.; MARTINELLI, G.; MAYO, S; FAY, M. F.; HUERTZ, M. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glazioviana* and *A. regina* (Bromeliaceae), *Heredity*, v. 101, p. 285 – 296, 2008.
- BARBARÁ, T.; MARTINELLI, G.; FAY, F.; MAYO, J.; LEXER, C. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae), *Molecular Ecology*, v.16, p. 1981 – 1992, 2007.
- BARBARÁ, T.; MARTINELLI, G.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M. F.; MAYO, S.; LEXER, C. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glazioviana*, *A. regina*, *a. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae), *Annals of Botany*, v. 103, 1, p. 65 – 77, 2009.

- BARFUSS, M. H. J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T. F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany*, v.92, 2, p. 337–351, 2005.
- BARTISH, I. V.; JEPPSON, N.; NIBBON, H. Population Genetic Structure in the Dioiceous pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology*, v.8, p.791 – 802, 1998.
- BENEVIDES, D. S.; MARACAJA, P. B.; FILHO, F. A. S.; GUERRA, A. M. N. M. Estudo da flora herbácea da caatinga no município de Caraúbas no estado do Rio Grande do Norte. *Revista Verde*, v.2, 1, p. 33–44, 2007.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, New York, New York, USA.
- BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.209 – 215, 2001.
- BOSSELIER-DUBAYLE, M; LEBLOIS, R.; SMANDI, S.; LAMBOUUDIÈRE, J.; SARTHOU, C. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana – a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography*, v.33, p.175 – 184, 2010.
- BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V.; The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution*, v.18, 5, p 249 – 256, 2004.
- BULTIN, R. K. Population Genomics and Speciation. *Genetica*, v. 138, 4, p. 409 – 418, 2010.
- BUERKLE, C. A.; GOMPERT, Z.; PARCHMAN, T. L. The n=1 constraint in population genomics. *Molecular Ecology*, v.20, 1575 – 1581, 2011.

- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAN, B. J. DNA Amplification Fingerprinting Using Arbitrary Oligonucleotide Primers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.42, p.189 - 200, 1993.
- CARNAVAL, A. C.; MORTIZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, v.35, p.1187 – 1201, 2008.
- CAVALLARI, M. M. Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba- SP, 2004.
- CAVALLARI, M. M.; FORZZA, R. C.; VEASEY, E. A.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation*, v. 15, p. 4357 – 4373, 2006.
- CAVALLI, S.S. 2003. Polimorfismos moleculares. In. Genética e Evolução Vegetal. Freitas, L. B. & Bered, F. Orgs. Porto Alegre, Editora da UFRGS, 413p.
- CHEW, T.; LUNA, E.; GONZÁLES, D. Phylogenetic Relationships of the Pseudobulbus *Tillandsia* species (Bromeliaceae) Inferred from Cladistic Analysis of ITS 2, 5.8S Ribosomal RNA Gene, and ETS Sequences. *Systematic Botany*, v.35, 1, p.86 – 95, 2010.
- COFFANI-NUNES, J. V. Revisão Taxonômica e Filogenia de *Portea* Brong. ex K. Koch (Bromelioideae - Bromeliaceae). Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- CONCEICÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M.; MEIRELLES, S. T. Ilhas de vegetação em afloramentos de quartzito-arenito no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, v.21, 2, p. 335 – 347, 2007.

- CONCEIÇÃO, A. A.; GIULIETTI, A. M. Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Hoheneia*, v.27, 3, 37 – 48, 2002.
- CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R.; MEIRELLES, S. T. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.30, 4, p.641 – 656, 2007.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P.; ASSIS, J. G. A.; BELLINTANI, M. C.; ANDRADE, J. C. S.; GUEDES, M. L. S. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*, v.23, 1, 173 – 177, 2000.
- CRONQUIST, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, Columbia University Press, 1262p.
- DOMINGUES, R.; MACHADO, M. A.; FORZZA, R. C.; MELO, T. D.; WOHLRES-VIANA, S.; VICCINI, L. F. Genetic variability of an endangered Bromeliaceae species (*Pitcairnia albiflos*) from the Brazilian Atlantic rainforest. *Genetic and Molecular Research*, v. 10, 4, p.2482 – 2491, 2011.
- DU, F. K.; PETIT, R. J.; LIU, J. Q. More introgression with less gene flow: chloroplast vs. mitochondrial DNA in the *Picea asperatai complex in China*, and comparisons with other Conifers, *Molecular Ecology*, v. 18, 1396 – 1407, 2009.
- FISCHER, M.; MATTHIES, D. RAPD variations in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, v. 85, 6, p.811 – 819, 1998.
- FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D.; PEINTINGER, M.; VAN KLEUNEN, M.; SCHMID, B. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, v. 87, 8, p.118 – 1137, 2000.

- FORZZA, R.C. Revisão Taxonômica de *Encholirium* Mast. Ex Schult & Schult. F. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v. 23, 1, p.1 – 49, 2005.
- FORZZA, R.C. *Filogenia da tribo Puyee Wittm. e revisão taxonômica do gênero Encholirium Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae)*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2001.
- FORZZA, R.C.; LEME, E.M.C.; RIBEIRO, O.B.C. *Encholirium pulchrum* and *E. diamantinum* spp. nov. (Bromeliaceae) from the Espinha ç o Range, Minas Gerais, Brazil. *Nordic Journal of Botany*, v.30, p.153 – 158, 2012.
- FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA-FILHO, J. A.; MARTINELLI, G. *Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006086>), 2010.
- FORZZA, R.C.; ZAPPI, D. Side by side: two remarkable new species of *Encholirium* Mart ex. Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) found in the Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brazil. *Kew Bulletin*, v. 66, p. 281 – 287, 2011
- FRANÇA, F.; MELO, E.; SANTOS, C. C. Flora de *inselbergs* da região de milagres, Bahia, Brasil: I. Caracterização da vegetação e lista de espécies de dois *inselbergs*. *Sitientibus*, v. 17, p. 163 – 184, 1997.
- FRANKHAM, R. Conservation Genetics. *Annual review in genetics*. v. 29, p. 305 – 327, 1995.
- FRANKHAM, R. Relationships of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology*, v. 10, 6, p. 1500 – 1508, 1996.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D., ELDRIGE, M. D. B., LACY, R. C.; RALLS, K. DUDASH, M. R.; FENSTER, C. B. Predicting the probability of Outbreeding Depression, *Conservation Biology*, v.25, 3, p. 465 – 475, 2011.

- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Systematic and Evolution*, v. 253, p. 65 – 80, 2005.
- GIULIETTI, A.M., HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, v.1, p. 52-61, 2005.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; EE, B. V.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONISISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYSTMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, v. 98, 5, p. 1 – 24, 2011.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical Biogeography of Bromeliaceae Inferred From *ndhF* Sequence Data. *Alisio*, v. 23, p. 3 – 26, 2007.
- GIVNISH, T.J.; MILLAM, K. C.; EVANS, T. M.; HALL, J. C. ; PIRES, J. C.; BERRY, P. E.; K. J. SYTSMA. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunction in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Science*, v. 165, p.S35–S54, 2004.
- GOMES, P.; ALVES, M. Floristic and vegetational aspects of an inselberg in the semi-arid region of northeast Brazil. *Edinburgh Journal of Botany*, v. 66, 2, p. 329–346, 2009.
- GONZALES-ASTORGA, J.; CRUZ-ARAGÓN, A.; FLORES-PALACIOS, A.; VOVIDES, A. P. Diversity and Genetic Structure of the Mexican endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany*, v. 94, p.545 – 551, 2004.

- GUERRA, M. D. F.; SOUZA, M. J. N; LUSTOSA, J. P. G. O domínio morfoclimático das caatingas: potencialidades naturais e fragilidades ambientais - considerações acerca dos sertões do médio Jaguaribe, Ceará. In: Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, Viçosa, MG. XIII SBGFA, 2009.
- HEYWOOD, V.H. 1993. Flowering plants of the World. Oxford University Press. New York. pp. 336.
- HORRES, R.; ZIZKA, G.; KAHL, G.; WEISING, K. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from trnL(UAA) intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biology*, v.2, p.306–315, 2000.
- HUANG, D. I.; FRIAR, E. A. Relationships in the *Luoubus albifrons* Species Complex 9Fabaceae) based on Two Highly Variable Chloroplast Regions. *Systematic Botany*, v. 36, 2, p.362 – 370, 2011.
- HUNTER, J. T. Persistence on inselbergs: the role of obligate seeders and resprouters. *Journal of Biogeography*, v. 30, p. 497 – 510, 2003.
- IZQUIERDO, L. Y.; PIÑERO, D. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Australian Journal of Botany*, v.48, p.645 – 650, 2000.
- JABALY, R. S.; SYSTMA, K. Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): Placement, major lineages, and Evolution of Chilean species. *American Journal of Botany*, v. 97, 2, p. 337 – 356, 2010.
- JANKOWSKI, C.; NASAR, F.; NAG, D. K. Meiotic instability of CAG repeat tracts occurs by double-strand break repair in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, p.2134 – 2139, 2000.
- JEHLEY, R. ARZEN, J. W. Review: microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal*, v. 12, p. 1-9, 2002.

- KANE, N. C.; KING, M. G.; BAKER, M. S.; RADUSKI, A.; KARRRENBURG, S.; KNAPP, S. J.; REISEBERG, L. H. Comparative genomic and population genetic analyses indicate highly porous genomes and high levels of gene flow between divergent *Helianthis* species. *Evolution*, v. 63, 8, p. 2061 – 2075, 2009.
- KELLER, L. F; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, v.17, 5, p.230 – 241, 2002.
- LACERDA, D. R.; ACEDI, M. D. P.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*, v. 3, 2, p. 87 – 92, 2002.
- LEAL, F. C.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.29, 3, p.379-389, 2006.
- LEAL, I. R.; DA SILVA, J. M.. TABARELLI, M. LACHER JR., T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade*, v.1, 1, p.139 – 146, 2005.
- LEME, E. M. C. Nominal Extinction and Responsibility of the Taxonomist: the example of Bromeliaceae in Brazil. *Taxon*, v. 52, p. 299-301, 2003.
- LEMOZ, J.R.; RODAL, M.J.N. Fitossociologia do componente lenhoso em um trecho de vegetação de caatinga no Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.16, p. 23-42, 2002.
- LI, Y.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T; BEILES, A.; NECO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, v.11, p.2453 – 2465, 2002.
- LIMA, M. L. A. Mapeamento de QTL Utilizando Microsatélites. In: *A botânica no Brasil. Pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais. 58.º Congresso Nacional de Botânica*. BARBOSA, L. M.; SANTOS-JÚNIOR, N. A. (Ed.). São Paulo, Sociedade Botânica do Brasil, 2007.

- LORENZON, M. C. A.; MATRANGOLO, C. A. R.; SCHOEREDER, J. H. Flora Visitada Pelas Abelhas Eussociais (Hymenoptera, Apidae) na Serra da Capivara, em Caatinga do Sul do Piauí. *Neotropical Entomology*, v.32, 1, p.027-036, 2003.
- MACHADO, I. C.; LOPES, A. V.; SAZIMA, M. Plant Sexual Systems and a Review of the Breeding System Studies in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. *Annals of Botany*, v. 97, n. 2, p. 277-287, 2006.
- NOVAES, R. M. L.; LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. N. Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Easter Tropical South America. *Molecular Ecology*, v. 19, p. 985 – 998, 2010.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, v.13, p.1143 – 1195, 2004.
- NYBOM, H.; BARTISH, A. Effects of life traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v.3, 2, p.93-114, 2000.
- OLIVEIRA, L. S. A. D.; SOARES, S. M. N. A.; SOARES, F. A. R.; BARROS, R. F. M. Levantamento Florístico do Parque Ambiental Paquetá, Batalha, Piauí. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, 2, p. 372 – 374, 2007.
- OLIVEIRA, P. E.; BARRETO, A. M. F.; SUGUIO, K. Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of life of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco River. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, v. 152, p. 319 – 337, 1999.
- OLIVEIRA, T. D.; RIBEIRO, M. C.; COSTA, I. L. L.; FARIA, F. S.; FIGUEIRA, J. E. C. Estabelecimento de espécies vegetais em um *inselberg* granítico de Mata Atlântica. *Revista Estudos de Biologia*, v. 26, 57, p. 17 – 24, 2004.
- PALMA-SILVA, C.; LEXER, C.; PAGGI, G. M.; BARBARÁ, T.; BREED, F.; BODANASE-ZANETTINI, M. H. Range-wide patterns of nuclear chloroplast DNA

- diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity*, v. 103, p. 503 – 512, 2009.
- PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; FAY, M.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology*, v. 20, p. 3185 – 3210, 2011.
- PARMENTIER, I.; HARDY, O. J. The impact of ecological differentiation and dispersal limitation on species turnover and phylogenetic structure of inselberg's plant communities. *Ecography*, v. 32, p. 613 – 622, 2009.
- PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, v, 5, p. 585 – 602, 2004.
- PEREIRA, R. J.; MONAHAM, W. B.; WAKE, D. B. Predictors for reproductive isolation in a ring species complex following genetic and ecological divergence. *BMC Evolutionary Biology*, v.11, 194 – 208, 2010.
- PETIT, R. J.; EXCOFFIER, L. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 24, 7, 386 – 393, 2009.
- PINHEIRO, K.; ALVES, M. Espécies arbóreas de uma área de Caatinga no sertão de Pernambuco, Brasil: dados preliminares. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5,2, p. 426-428, 2007.
- PINHEIRO, K.; RODAL, M. J.; ALVES, M. Floristic composition of different soil types in a semi-arid region of Brazil. *Revista Caatinga*, v. 23, 2, p. 68 – 77, 2010.
- PORTO, P. A. F.; ALMEIDA, A.; PESSOA, J. W.; TROVÃO, D.; FELIX, L. P. Composição florística de um inselbergue no agreste paraibano, município de Esperança, Nordeste Brasileiro. *Revista Caatinga*, v.21, 2, p. 214 – 222, 2008.
- POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habit types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 30, 4, p. 579 – 586, 2007.

- POREMBSKI, S.; MARTINELLI, G.; OHLEMÜLLER, R.; BARTHLOTT, W. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic Forest. *Diversity and Distributions*, v. 4, p. 107 – 119, 1998.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT W. *Pitcairnia feliciana*: The only indigenous African bromeliad. *Harvard Papers in Botany*, v.4, p.175 – 184, 1999.
- RAMALHO, M.; BATISTA, M. A.; SILVA, M. *Xylocopa (Monoxylocopa) abbreviata* Hurd & Moure (Hymenoptera: Apidae) e *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): Uma Associação Estreita no Semi-Árido do Brasil Tropical. *Neotropical Entomology*, v.33, 4, p. 417 – 425, 2004.
- RAUH, W. Bromelienstudien XIX. *Trop. Subtrop. Pflanzenwel.*, v.60, p.907-1004, 1987.
- REITZ, R. *Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 1983.
- REX, M.; SCHULTE, K.; ZIZKA, G.; PETERS, J.; VÁSQUEZ, R.; IBISCH, P. L.; WEISING, K. Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v.51, 3, p.472-485, 2009.
- ROMERO, G. Q.; NOMURA, F.; GONÇALVES, A. Z.; DIAS, N. Y. N.; MERCIER, H.; CONFORTO, E. C.; ROSSA-FERES, D. C. Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. *Oecologia*, v162, p. 941 – 949, 2010.
- SARTHOU, C.; SAMADI, S.; BOISSELIER-DUBAYLE, M. K. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyseskii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany*, v. 88, 5, p.861 – 868, 2001.
- SARTHOU, C.; VILLERS, J. Epilithic plant communities on inselbergs in French Guiana. *Journal of Vegetation Science*, v. 9, 847 – 860, 1998.

- SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 53, p 559 – 571, 2010.
- SAZIMA, I.; VOGEL, S.; SAZIMA, M. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Plant Systematic and Evolution*, v. 168, 167 – 179, 1989.
- SCARANO, F. R. Rock outcrop vegetation in Brazil: a brief overview. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 30, 4, p. 561 – 568, 2007.
- SCHLÖTERER, C. The evolution of molecular markers – Just matter of fashion. *Nature Reviews Genetics*, v.5, p.63 – 69, 2004.
- SCHULTE, K.; BARFUSS, M. H. J.; ZIZKA, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.49, 327 -339, 2009.
- SGORBATI, S.; LABRA, M.; GRUGNI, E.; BARCACCIA, G.; GALASSO, G.; BONI, U.; MUCCIARELLI, M.; CITTERIO, S.; IRAMÁTEGUI, A. B.; GONZALES, L. V.; SCANNERINI, S. A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes, *Plant Biology*, v.6, p. 222–230, 2004.
- SILVA, K. A.; ARAÚJO, E. L.; FERRAZ, E. M. N. Estudo florístico do componente herbáceo e relação com solos em áreas de caatinga do embasamento cristalino e bacia sedimentar, Petrolândia, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*. v. 23, 1, p. 100-110, 2009.
- SILVEIRA, S. G.; AMORIM, E. P.; JESUS, O. N.; SOUZA, F. V. D.; PESTANA, K. N.; SANTOS, V. J.; SANTADA, J. R. F. Variabilidade genética de populações naturais de caroá por meio de marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, 3, p. 283 – 290, 2009.
- SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. Foral biology of *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. *Bromelia*, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1-4, p. 3-13, 1998.

- SIQUEIRA-FILHO, J. A.; LEME, E. M. C. 2006. *Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: Biodiversidade, conservação e suas bromélias*. Andrea Jakobsson Estúdio Editorial Ltda., Rio de Janeiro. 416 p.
- SITES, J. W.; MARSHALL, J.C. Operational Criteria for Delimiting Species. *Annual Review on Ecology, Evolution and Systematics*, v.35, p. 199 – 227, 2004
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. 1974. *Flora Neotropica - Monograph 14 - Pitcairnioideae*, Halfner Press, New York, 660p.
- SOUSA, L. O. Revisão taxonômica e filogenia do gênero *Lymania* Read. (Bromelioideae – Bromeliaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 102p, 2004.
- SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Revista Agropecuária Brasileira*, v.43, 7, p. 843 – 849, 2008.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2.^a Ed. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2008.
- TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany*. v.84, 5, p.664–670, 1997.
- THOMÉ, M. T. C.; ZAMUIDO, K. R.; GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, F. A. B.; ALEXANDRINO, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 55, p. 1018 – 1031, 2010.
- VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PEREYRN, F. G. C. (eds). 2002. *Ecorregiões – Proposta para o bioma Caatinga*. Recife: Associação de plantas do Nordeste, 81p.

- VERSIEUX, L. M.; WENDT, T.; LOUZADA, R. B.; WANDERLEY, M. G. L. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, v.4, 1 – 2, p. 98 – 110, 2008.
- WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S.E. 1992. Bromeliaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETTI, A. M. (Org.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. 1 ed. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 5, p. 1-476, 2007.
- WANDERLEY, M. G. L.; MOLLO, L. 1992. Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso (São Paulo, Brasil). Bromeliaceae. São Paulo, SP (Brazil). p. 89-140.
- WANDERLEY, M. G. L.; FORZZA, R. C. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Bromeliaceae. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* v.2, p. 131-139, 2003.
- WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions on PCR-Based methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. *Molecular Systematic of Plants II. DNA sequencing*. Springer, 1998.
- ZANELLA, C. M.; BRUXEL, M.; PAGGI, G. M.; GOETZE, M.; BUTTOW, M. V.; CIDADE, F. W.; BREED, F. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiachantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, v.98, 9, 1511 – 1519, 2011.
- ZHOU, Y. F.; ABBOTT, R. J.; JIANG, A. Y.; DU, F. K.; MILNE, R. I.; LIU, J. Q. Gene flow and species delimitation: a case study of two pine species with overlapping distributions in southeast China. *Evolution*, v.64, 8, 2342 – 2352, 2010.
- ZIZKA, G.; SCHMIDT, M.; SCHULTE, K.; NOVOA, P.; PINTO, R.; KÖNIG, K. Chilean Bromeliaceae: diversity, distribution and evaluation of conservation status. *Biodiversity and Conservation*, v.18, 9, 2449-2471, 2009.
- ZUCCHI, M. I. Uso de marcadores Microssatélites na Estimação de Parâmetros Genéticos Populacionais em Plantas. In: *A botânica no Brasil. Pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. 58.º Congresso Nacional de Botânica. 2007.

CAPÍTULO 2

Manuscrito de artigo científico

Morphological variation, ecology and genetics of *Encholirium spectabile* on Caatinga inselbergs. Three aspects clarified by genetic structure analysis

Rodrigo César Gonçalves-Oliveira, Marccus Vinicius Alves e Ana Maria Benko-Iseppon

A ser submetido ao Periódico PLANT BIOLOGY

Morphological variation, ecology and genetics of *Encholirium spectabile* on Caatinga inselbergs. Three aspects clarified by genetic structure analysis

RODRIGO CÉSAR GONÇALVES-OLIVEIRA ^{1,2}, MARCCUS VINICIUS ALVES ³, ANA MARIA BENKO-ISEPPON ^{1,2}.

- 1- Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
- 2- Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
- 3- Laboratório de Morfo-taxonomia Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

Author for correspondence:

Ana Maria Benko Iseppon - ana.iseppon@gmail.com

Av. Prof. Moraes Rego, sn. CCS – Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal – Cidade Universitária – Recife – PE – Brasil.

Abstract

E. spectabile is rocky outcrop obligate specie occurring on northeast inselbergs, it shows a great morphological diversity on common taxonomy used characters where other species were described. Bromeliads are reported as great models to study species radiation on neotropical inselbergs. Fingerprinting molecular markers (DAF and ISSR) were applied, where eleven primers generated 99 loci. Two genetic groups were found by Bayesian clustering ($K=2$) as so as by a neighbor joining tree, one on the northern region, and related to long-pedicells species and other on south related to short-pedicells species. Our assemblage $H_e = 0.3417$. Genetic structure showed that there structuration between populations ($\Phi_{st} = 0.3781$) that are also related to geographical groups. On northern group close populations shows relative similarities on pairwise Φ_{st} and grouping on the dendogram. The genetic structure here presented is congruent with outcrossing species, and the behavior of the known floral visitors is congruent with a short to medium distance dispersal, considering the range of the specie. These results conclude that the great morphological diversity regards to a single specie and each morph type should be considered for ex-situ conservation.

Keywords: Bromeliaceae, Northeastern Brazil, Fingerprinting, DAF, ISSR.

Introduction

Encholirium genus comprises to 29 accepted bromeliad species commonly founded on Brazilian eastern shield rocky outcrops, especially on ‘espinhaço’ mountains chain, where the majority endemisms on bromeliads are founded (Versieux *et al.* 2008; Forzza *et al.* 2010). The most widespread specie is *E. spectabile* Mart ex. Schult & Schult. f. occurring on northeastern Brazil rocky outcrops (Forzza 2005; Gomes & Alves 2009, 2010). This specie presents great morphological diversity in a geographical range, specially on characters commonly used do delimit species as floral bracts size, pedicels size, size of the escape bracts etc. Morphology led taxonomist to describe other species differing on these characters, which mainly based on herbaria inappropriate material (Forzza 2005). These binomials on the species complex were treated as synonymous by the last taxonomic review, which considers the morphological characters founded compounding unique specie with a large morphology variation (Forzza 2005). Despite a great variability on its geographic range, two major morphological groups are distinguishable, one short-pedicel flowers located on north limit of ‘espinhaço’ range and a long-pedicel flowers on Caatinga rocky outcrops (Forzza 2005). Vegetative reproduction by Stolons are commonly founded on the field, however in relation to its sexual reproduction, this specie is treated as bat pollinated, as it’s relatives *E. subsecundum* and *E. vogelii* (Sazima et al 1989, Cristianini et al. 2012), although bees and hummingbirds are commonly identified as floral visitors on its big and yellow inflorescences (Lorenzon *et al.* 2003; Aguiar *et al.* 2012)

Espinhaço chais is characterized by rocky fields that ranges from Minas Gerais on South until the region of Jacobina on North (Gontijo 2008), inside the Caatinga domain. Caatinga is the most dominant flora on northeastern Brazil, comprising to dry vegetation on sedimentary soils composed by shrubs and spars trees. The flora presents adaptations to a lack

of rain in the most part of the year as spines, succulence, senescence of leaves, CAM physiology and parenchyma to retain water (Leal *et al.* 2005). Seven ecological regions are distinguishable by their plant species composition, soil, climate, water offer and geological origin (Velloso *et al.* 2002). On this domain is common to find isolated rocky outcrops of gneissic origin that abruptly arise on a plan relief, considered as terrestrial habitat islands because of their strong spatial and ecological isolation (Probenski *et al.* 1998). They also present different microclimate from their surrounding, as higher temperatures and less water, which favors a dominant strictly adopted flora to survive (Probenski 2007). Neotropical inselbergs are distinguishable by three major groups of angiosperms, Velloziaceae, Cactaceae and Bromeliaceae, particularly Caatinga domain inselbergs are physiognomy characterized the *E. spectabile*, occurring on sites between 240 and 800 m (França *et al.* 2005, Probenski 2007; Gomes & Alves 2009).

Inselberg bromeliads species have been used as model for population genetic studies aiming understand ecological patterns as pollination vs. seed dispersal, biogeography, conservancy of endangered species and species delimitation. To access this information co-dominant and dominant molecular markers have been successfully applied, allowing insights about genetic diversity, genetic structure, within-population patterns and species cohesion. (Barbará *et al.* 2007, 2008, 2009; Cavallari *et al.* 2006; Domingues *et al.* 2011; Palma-Silva *et al.* 2011). Fingerprinting DAF and ISSR are largely applied dominant molecular markers, and seems to be a good choice to access population genetic structure of native plants, for the reason that they don't need prior information about genetic loci, are greatly polymorphic and present low cost in comparison to other markers. Furthermore they have the advantage of being high polymorphic and low cost compared with other markers (Weising *et al.* 2005).

This work aims (i) characterize genetic diversity and genetic structure of *E. spectabile* populations on northeastern Brazil, (ii) correlate described morphological diversity with

genetic structure in geographical range (iii) give insights about association of genetic structure and *E. spectabile* pollination system.

Materials and methods

Study sites and population sampling

Encholirium spectabile is a rupicolous bromeliad restrict to rocky outcrops of northeastern Brazil, their rosettes occurs in vegetation islands. Small and large populations are founded. Eight of them were selected to this study (Figure 1A, Table 2). Two from short-pedicel group held on northern limit of espinhaço range region consisting of Jacobina (JAC) and Lajedo Bordado (LBD) populations and the population of Jequié (JEQ) is located on the southern limit of the species occurrence also presented short pedicels. Four populations were collected on Rio São Francisco vicinity, Sobradinho (SOB), Fazenda Pé-da-Laje (FPL), Candindé do São Francisco (CSF) and Ilha do Fogo (IFG). Two other populations from Bortborema Plateau, Cupira (CUP) and Brejo da Madre de Deus (BMD).

Young leaves of individuals were collected and conserved on NaCl-CTAB concentrated solution (Rogstad 1992). Individuals were randomly chosen with a distance of five meters from each other, to avoid collect of clones.

Molecular procedures

The genomic DNA was extracted from leaves tissue using the protocol described by Weising et al. (1995), with changes in plant material weight (5 – 2g), CTAB buffer (12 – 15 ml) and reduction to one wash with CIAA.

Forty ISSR and DAF primers were pre-selected which ten were applied (Table 1) on 86 individuals. DAF is known as an analogous of RAPD, nevertheless is being described as

more accurate due a high concentration of primers in a low quantity of template DNA, amplifying random sites of DNA. On the other hand, ISSR primers anchors on microsatellite sites amplifying it's flanks regions. (Weising *et al.* 2005; Bornet & Branchard 2001) PCR reaction components for DAF were applied following Caetano-Anollés *et al.* (1991) with changes described by Winter *et al.* (2000) and Benko-Iseppon *et al.* (2003). Thus, the reactions consisted in 0,5 ng/μL of target DNA, 1,5 μL TAQ – buffer 10x, 2,5 mM of MgCl₂, 10 mM of dNTP-mix (Fermentas ®), 20 μM of primer and 0,8 U ‘*Taq* DNA polimerase’ (Fermentas ®), with final volume of 15 μL. The technique was carried out in Eppendorf Mystecycler Gradient ® termocycler. The program applied was desnaturation at 95° C of 15 sec., and 40 cycles of desnaturation of 15 sec. at 95°C; annealing with 1 min. at 35° C e final extension of 2 min. at 72°C. The ISSR reactions were performed following Bornet and Branchard (2001) protocol. In 20 μl reactions the volume contained 5 ηg (4 μl) of genomic DNA, 10x TAQ - buffer (2 μl), 25 mM MgCl₂ (2 μl), 10mM dNTP-mix (1,5 μl), 50 pmol degenerate primer (1μl) and 0,8 U *Taq* DNA polymerase (0,15 μl). The PCR cycling conditions was desnaturation at 94°C for 4 min and 35 cycles at 94°C for 30 sec, 50.4 to 60.5° C depending on the primer for 45 sec. , 72° C for 2 min with a final extension at 7 min at 72° C. DAF and ISSR reaction products were separated on 1.8% horizontal agarose gels, in 0,5 X TBE buffer for 4 hours at a voltage of 80 V and visualized under ultraviolet light after staining in 0,5 μg/ml ethidium bromide. A DNA ladder 100pb was used as a molecular weight standard. Digital photo documentation was taken for each gel.

Statistical analysis

Agarose gels were manually analyzed and a matrix was built, based on presence and absence of each loci. Main genetic diversity indexes as Expected Heterozigosity (H_e) and number of Polimorphysms were calculated on ARLEQUIN 3.1 (Excoffier and Schneider,

2006). Bayesian clustering with the software program, STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.* 2000), was used to assign individuals to genetic clusters (K). The proportion of membership for each cluster was calculated without the consideration of sampling localities. The analyses were carried out under the admixture model assuming independent allele frequencies and using a burn-in period of 100 000, run lengths of 1 000 000 and 10 iterations per K ranging from 1 to 9 to confirm stabilization of the summary statistics (Pritchard *et al.* 2000). To determine the most likely number of clusters (K) present in the data, we used the method proposed by Evanno *et al.* (2005), which is based upon an ad hoc measure ΔK that evaluates the second-order rate of change of the likelihood function with respect to K were build on Structure Harvester (Earl *et al.* 2012).

Performed Bayesian groups were submitted to an AMOVA statistical genetic structure analysis which were carried out in ARLEQUIN 3.2 (Excoffier & Schneider, 2006) calculating Φ_{st} , Φ_{sc} and Φ_{ct} (Weir & Cokerham, 1984) and AMOVA (10 000 replicates for each test) which provides a among groups, within groups and within population level of shared genetic diversity. A mantel test were performed where pairwise Φ_{st} and geographic distances matrixes were correlated

The statistical analysis of AMOVA, Mantel Test and Expected Heterosigozity measurement were also conducted for each morphological group.

Results

DAF and ISSR polymorphisms and Encholirium spectabile genetic diversity

Ninety-four polymorphic loci were generated by DAF and ISSR primers, some data were missing representing 5.84%. The most reliable primer was ISSR 886 where 15 loci were

visualized. (Table 1). Average expected heterozygosity H_e was 0.2349 SD ± 0.0392 and total H_e were 0.3417. The northern long pedicels populations presented $H_e = 0,33133$ and southern populations $H_e = 0,25166$. Populations FPL and IFG presented the highest polymorphisms among the 99 loci. (Table2) Regarding the estimation of H_e for each population, FPL showed the highest expected heterozygosity ($H_e = 0.30723$), while CSF population the smallest ($H_e = 0.17447$) (Table 2). The number of loci is not directly related to the H_e , as in JEQ population that has only 35 polymorphic loci and H_e of 0.2287.

Genetic structure of Encholirium spectabile

Bayesian clustering analysis showed that this sample forms two genetic groups ($K=2$) (Figure 1C), concerning to a group of long pedicels on north and short pedicels on south. These same patterns are also identified on Neighbour-joining dendrogram where a brake between north and south populations is clear (Figure 1B). Inside North population is possible identify that CSF individuals groups together, it's in addition clear a IFG/SOB/FPL cluster, that are related to Petrolina-Juazeiro xeric "Caatinga" region. Borborema plateau populations BMD and CUP comprises sub-branches groups on northern populations. Mantel test pointed to significant correlation between geographical distance and genetic differentiation ($r = 0.3578$, $p \geq 0.033$) Figure S1. Furthermore, there were no correlation between geographical and genetic distances when only southern or only northern populations are compared. Bayesian northern and southern groups shares 16.17 % of genetic diversity, and present a differentiation index of $\Phi_{ct} = 0.16174$, reinforcing the idea of gene flow between these two regions. AMOVA results pointed to high structuration of populations, where the most of diversity are shared within-populations (66.26 %). It's also clear when within populations diversity is compared among population (Table 4). Significant structure among populations

was clear, when Φ_{st} (0.37816). Northern group Φ_{st} were 0.26142 , and southern group 0.2148. No considerable differentiations in terms of absolute values were observable between the distribution of genetic diversity of northern compared to southern populations .

Pairwise Φ_{st} where higher when SOB and JAC populations were compared with other populations, so are the most divergent populations. Pairwise population divergence were not significant between near populations as FPL x IFG and BMD x CUP, supporting the idea of a geographic pattern of genetic distribution (Table 3). When compared southern and northern populations also presented significant pairwise Φ_{st} values, confirming the split between these two regions. Populations CSF and BMD populations also presents high differentiation values inside northern group.

Discussion

Genetic diversity, genetic structure and within population peculiarities. Is the morphological diversity described to E. spectabile also presented on its genetic structure?

On the last decades inselberg plants genetic diversity and structure were largely studied as a model to study population divergence and ecological speciation on continental radiation (Sarhou *et al.* 2001; Barbará *et al.* 2007, 2009; Palma-Silva *et al.* 2011). The expected heterosigosity on *Encholirium spectabile* is in concordance with other *Encholirium species* as *E. subsecundum* on Serra do Cipó, *E. biflorum* and *E. pedicellatum* on Diamantina Plateau, as so as other Pitcairinoideae species analysed by fingerprinting markers as *Pitcairnia albiflos* (Cavallari *et al.* 2006; Domingues *et al.* 2011).

The lowest value of H_e founded on CSF population, with only 44 % of polymorphisms, may be related to different environmental conditions that can hinder establishment of new plants. This population is located on small rocky outcrops in the middle

of a dense Caatinga matrix, with the presence of sand, that also can isolate this population from the surrounding and reducing genetic diversity over generations. Elements as soil and altitude can interfere on *Encholirium spectabile* establishment, they were found only in altitudes between 240 and 780 m on Pedra Antônio Bezerra (França *et al.* 2005, Gomes & Alves 2009).

Despite the identical fingerprinting profiles between two individuals on CSF populations, clonally reproduction may not play an important role on the species reproduction, but only on species maintenance on studies sites. The Clonal reproduction on Inselberg bromeliads were supported in some species as *Pitcairnia geiskesii* and refuted in other species as *Encholirium subsecundum*, *E. biflorum*, *E. pedicellatum* (Sathou *et al.* 2001, Cavallari *et al.* 2006) Other genus as *Alcantarea*, shows that dependence of ecological factors as altitude makes influences on the presence or absence of clonal reproduction (Barbará *et al.* 2007, 2008, 2009). This subject is also discussed below.

Physical geographic barriers usually affect the current dynamics of plants and animals in contrasted ways, respectively by breaking or enhancing gene flow, one of these barriers for Inselberg plant populations is the field matrix, as so as they are described as inland islands (Probenski, 2007; Bosselier-Dubayle *et al.* 2010). The diversity center to *Encholirium* genus is located on Espinhaço chain rocky outcrops on southeastern Brazil, despite several other species were described for Caatinga domain and treated as one single specie on “spectabile” species complex, and caatinga should be the second diversity place (Forzza, 2005). Inselbergs have been treated of main evolutionary significance for the differentiation of local populations and so crucial for speciation process on *Encholirium* species (Probenski *et al.* 1998), so a great genetic diversity and geographic genetic distribution is expected for *E. spectabile*. Nevertheless the great morphological diversity here sampled, the generated marks represent two genetic groups (K=2) being each profile correlated to a geographic region (Picture 2).

The North – Southern split identified on the results of Bayesian and Neighbour-joining clustering corroborates with the morphological split identified between populations of North Espinhaço chain and Caatinga morphs.

Due microclimate and geological features, environmental factors as climate, soil conditions and vicinity are factors treated to affect the establishment of rocky outcrop floras (Conceição & Giulietti 2005; Gomes & Alves 2009). The same pattern is observable on the Southern Espinhaço in Brazil, the north-south position of this highland chain shows differences on geological, climatic and biotic conditions and led these areas to be treated as different endemic plants (Enternach *et al.* 2011). Sub-branches identified on northern group and pairwise Φ_{st} values shows that the vicinity also plays an important role on genetic similarities of each population.

Significant differentiation among populations were considerable ($\Phi_{st} = 0.3781$) as so as Mantel test results displays correlation between genetic and geographic distances, suggesting isolation by distance. Otherwise, within group analysis shows no correlation between genetic and geographic distances. It is also supported by AMOVA results where the majority of genetic diversity is held inside the population (Table 4). These results led conclusions that the two *E. spectabile* morphs are isolated by distance, and near populations are more related to each other. This is another effect of vicinity, for *E. spectabilie* as so as other wind dispersed species, the seeds tend to have a low power of dispersal, being founded only a few meters near the mother plant (Cavallari *et al* 2006). This can explain the vicinity factor presented on genetic structure of *E. spectabile*.

Vicinity was also significant for genetic structure in other rocky outcrop species as *Pitcairnia geyskesii* on a tropical forest matrix (Bosselieur-Dubayle *et al.* 2011). Other inselberg bromeliads as *P. staminea* and *P. albiflos*, species restricted to Rio de Janeiro rocky outcrops, presented no significant correlation between genetic and geographic distances, a fact

that may be related to a great differentiation between populations of the same specie (Palma-Silva *et al* 2011). Isolation by distance was also visualized on a wide range analysis with *Vriesea gigantea*. (Palma-Silva *et al.* 2009).

Genetic flow between the morphs seems to be low, but no absent, as is observable by F-statistics analysis, where the populations shows no structuration between regions ($\Phi_{ct} = 0.16174$), the same way genetic differentiation between southern and northern populations is overall bigger when pairwise Fst analysis is considered. The differences between northern and southern populations agree with the idea of a split between the floras of espinhaço range, these is more related to “cerrados” and caatinga respectively (Gomes & Alves 2009).

The differentiations between geographical distance and genetic divergence among northern and southern populations and significant differentiation in pairwise Φ_{st} analysis support Forzza (2005). Here we found two morphs with considerable gene flow so the morphological diversity observed do not necessarily represent different species, nevertheless, unique specie with a great morphological divergence. Phenotypic differences of fruits were observed on *Bromelia antiachanta* species where considerable nevertheless no considerable genetic differentiation was visualized (Zanella *et al.* 2011).

What the implications of genetic structure and genetic diversity on E. spectabile establishment and reproduction on Northeastern Inselbergs?

According to its floral attributes, as position of floral parts and light color of corolla *E. spectabile* seems to be bat pollinated, although hummingbirds and generalist bees have been also reported in the literature (Lorenzon *et al.* 2003; Leal *et al.* 2006; Siqueira-Filho & Leme 2006; Aguiar *et al.* 2012), and were observed in our collecting sites. A large genetic diversity ratio among population (AMOVA 21.64 % - Table 4) is correspondent to in outcrossing plant

species, that usually have between 10 and 20% of the total variance among populations (Hamrick & Godt 1989). These factors may be related to the behavior of its possible pollinators.

Despite their size, bees were observed visiting all parts of open flowers, being possibly attracted by nectar and pollen (Lorenzon *et al.* 2003, Aguiar *et al.* 2012), and thus occasionally promoting pollination between close relatives. If some temporal or spatial barrier occur on *E. spectabile*, as reported to other *Encholirium* species (Sazima *et al.* 1989; Christianini *et al.* 2012), these bees' habit and different stage flowers observed in a single inflorescence might support selfing by geitonogamy. The behavior of *Loncophylla bokermani* on *E. subsecundum* flowers visiting more than one flower per plant and close plants inflorescences (Sazima *et al.* 1989), *Glossophaga* bats have been reported as *Encholirium spectabile* floral visitors (Siqueira-Filho & Leme 2006) and may allow reproduction between close relatives, because these animals presents a behavior that maintain a memory of the last visited sites, only near plants should be visited as well (Mendes 2008). This may be balanced by incompatibilities systems, and so permitting a great share of within population diversity (Table 4). Little animals, as bees and sphingid moths are reported as effective pollinators promoting local gene flow between *Alcantarea* specimens in Atlantic Rain Forest inselbergs (Barbará *et al.* 2007). Bayesian clusters grouping relatively close inselbergs consistent with short to average-distance pollination.

This species produces a great number of seeds, although seedling establishment on field seems to be dependent of fissures on the rocks and not to be frequent. In other *Encholirium* species as *E. biflorum* the seedling is really scarce, maybe result of a irregular phenology, otherwise the most of the species as *E. vogelii*, *E. heloiseae* and *E. pedicellatum* the seedling is more abundant, that might be result of a synchronized flowering (Cavallari *et al.* 2006, Cristianini *et al.* 2012). No phonological features were studied here, but some

differences between phenology on populations of northern and southern populations were visualized. In *Puya raimondii* a large scale seed production strategy is adopted and high selfing coefficient (Sgorbati *et al.* 2004). Seed production on *E. spectabile* is large and presents a good germination ratio on laboratory conditions, even after a long storage time (data not presented).

Clonal reproduction is common on bromeliads and were also observed on this species. Low genetic diversity levels and lack of vegetative reproduction were reported for three *Encholirium* species with dominant sexual reproduction on Espinhaço range (Cavallari *et al.* 2006). Nevertheless, on this work sampling strategy and the absence of identical fingerprinting profiles do not allow inferences about the frequency of vegetative reproduction. On the field were observed lots of rosettes linked with the others by stolons that grows on the rocks, this work were not able to detect such clonally reproduction due avoidance of clones. On rock outcrops the maintenance of bromeliad mats may favor the establishment of new individuals by providence of new sites for the anchor of seeds. On the other hand, our experience regarding plants of this species cultivated on greenhouses during two years (unpublished data) revealed no clonal reproduction, indicating that this strategy may not be obligatory. Within-population studies are been developed by this workgroup and will better analyze this question and field work regarding pollination and reproduction system may be considered.

In what do the attributes here discussed implies for E. spectabile conservation

E. spectabile conservation on northeastern rocky outcrops may be considered, this specie is the dominant on Caatinga inselbergs and may play a capital interest for conservation of other species, as *Xylocopa abbreviata* (Ramalho *et al.* 2004) who depends directly from

this plant scapes to nidify their offspring and other plant species restricted to inselbergs. Great morphological diversity led taxonomists to identify different species (Forzza 2005), however our result uphold the maintenance of one specie, otherwise morphological differences and genetic groups here studied may be considered, conserving not only the specie, but both morphs as so as the morphological diversity here represented and all the ecosystem it is part of. Other northern populations as CSF and Borborema Plateau populations may have especial interest because they are founded within montane tropical forest related, as so as each represented a single group on northern populations, diverging from the Caatinga restricted group of SOB/IFG/FPL.

Ex situ conservations in seed germplasm banks should be possible, but difficulties on plantule establishment led conclusions that *E. spectabile* conservation may occur *in situ*, comprising in populations that considers near populations and the groups here presented.

References

- Barbará T., Lexer C., Martinelli, G., Mayo S., Fay M.F., Huertz M. (2008) Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glazioviana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity*, **101**, 285 – 296.
- Barbará T., Martinelli G., Fay F., Mayo S.J., Lexer C. (2007) Population differentiation and species choesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology*, **16**, 981 – 1992.
- Barbará, T., Martinelli, G., Palma-Silva, C., Fay, M.F., Mayo, S., Lexer, C. (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouiana*, *A. regina*, *a. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany*. **103**, 65 – 77.
- Bosselier-Dubayle, M; Leblois, R.; Smandi, S.; Lambouudière, J.; Sarthou, C. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana – a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography*, v.33, p.175 – 184, 2010.

- Cavallari M.M., Forzza R.C., Veasey E.A., Zucchi M.I., Oliveira G.C.X. (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation*, **15**, 4357 – 4373.
- Domingues R., Machado M.A., Forzza R.C., Melo T.D., Wohlfres-Viana S., Viccini L.F. (2011) Genetic variability of an endangered Bromeliaceae species (*Pitcairnia albiflos*) from the Brazilian Atlantic rainforest. *Genetic and Molecular Resources*, **10**, 2482–2491.
- Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Forzza R.C. (2005) Revisão Taxonômica de *Encholirium* Mart. Ex Schult & Schult. F. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, **23**, 1 – 49.
- Forzza R.C., Costa, A., Siqueira-Filho J. A., Martinelli G. (2010) *Bromeliaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006086>)
- Gomes P., Alves M. (2009) Floristic and vegetational aspects of an inselberg in the semi-arid region of northeast Brazil. *Edinburgh Journal of Botany*, **66**, 329–346.
- Hunter, J. T. 2003. Persistence on inselbergs: the role of obligate seeders and resprouters. *Journal of Biogeography*, **30**, 497 – 510.
- Leal F.C., Lopes A.V., Machado I.C. (2006) Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **29**, 379-389.
- Leal I.R., Da Silva J.M., Tabarelli M., Lacher J.R. (2005) Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade*, **1**, 139 – 146.
- Leal, F. C.; Lopes, A. V. & Machado, I. C. Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. v.29, n.3, p.379-389, 2006.
- Lorenzon, M. C. A.; Matrangolo, C. A. R. & Schoereder, J. H. Flora Visitada Pelas Abelhas Eussociais (Hymenoptera, Apidae) na Serra da Capivara, em Caatinga do Sul do Piauí. *Neotropical Entomology*. v.32 (1), p.027-036, 2003.
- Mendes, E. A. L. Avaliação da memória de morcegos nectarívoros da espécie *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae). São Paulo, 2008 62p. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, 2008.

- Palma-Silva C., Lexer C., Paggi G. M., Barbará T., Breed, F., Bodanase-Zanettini M.H. (2009) Range-wide patterns of nuclear chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity*, **6**, 506 - 512.
- Porembski S. (2007) Tropical inselbergs: habit types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica*, **30**, 579 – 586.
- Ramalho M., Batista M.A., Silva M. (2004) *Xylocopa* (*Monoxylocopa*) *abbreviata* Hurd & Moure (Hymenoptera : Apidae) e *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): Uma Associação Estreita no Semi-Árido do Brasil Tropical. *Neotropical Entomology*, **33**, 417 – 425.
- Sazima I., Vogel S., Sazima M. (1989) Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Plant Systematic and Evolution*, **168**, 167 – 179.
- Sgorbati S.; Labra M.; Grugni E.; Barcaccia G.; Galasso G. U.; Boni M.; Mucciarelli S.; Citterio A.; Benavides-Iramátegui L.; Venero-Gonzales L., Scannerini S. (2008) A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biology*, **6**, 222–230.
- Siqueira-Filho, J. A. & Leme, E. M. C. 2006. *Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste: Biodiversidade, conservação e suas bromélias*. Andrea Jakobsson Estúdio Editorial Ltda., Rio de Janeiro. 416 p.
- Velloso, A. L.; Sampaio, E. V. S. B.; Pereyn, F. G. C. (eds). 2002. *Ecorregiões – Proposta para o bioma Caatinga*. Recife: Associação de plantas do Nordeste, 81p.
- Versieux L.M., Wendt T, Louzada R.B., Wanderley M.G.L. (2008) Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, **4**, 98 – 110.
- Zanella C.M., Bruxel M., Paggi, G.M., Goetze M., Buttow M.V., Cidade, F.W., Breed, F. (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicianl tetraploid species *Bromelia antiachantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, **98**, 1511 – 1519.

Acknowledgements

The present research work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) program PNADB (Project 595/2010, AUX-PE: 23038.000038/2010-31) and PROBRAL (Project 354/11, AUX-PE: 23038.000014/2011-62). We thank to Graça Wanderley and Clarisse Silva by the cooperation. We also thank the masters fellowship offered by CAPES that were vital to this work development.

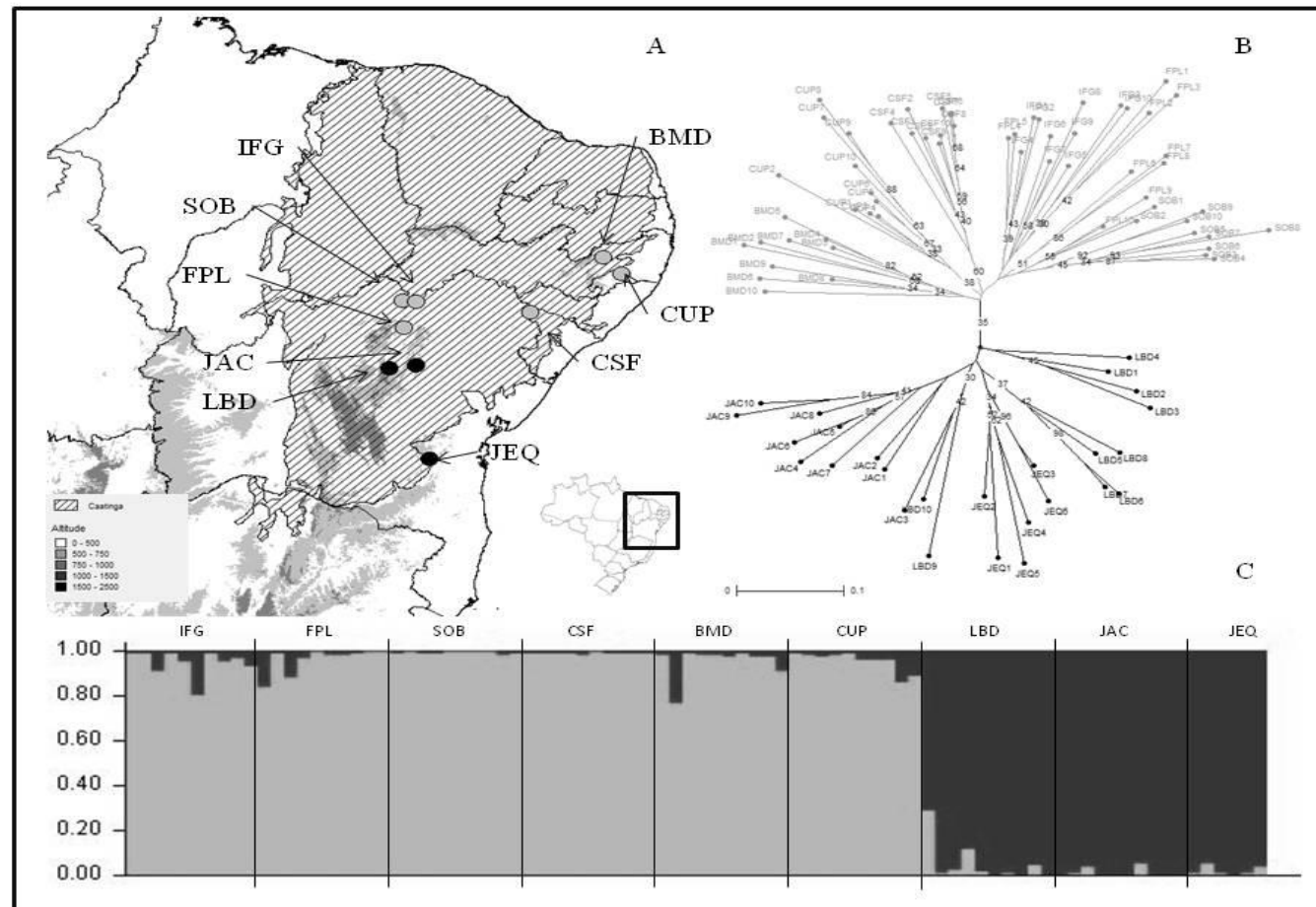


Figure 1 – A – Map with collect plots, population labels are indicated by the arrows. Black circles – Southern short pedicells populations. Grey circles – northern populations with short pedicells. B – Neighbor-joining dendrogram showing split between southern (Black) and northern (Grey) populations. C – Structure graphic representing $K=2$. On the left side the scale indicates the sort of admixture in each individual (Q).

Table 1 - Primers name, sequences and Polymorphic Loci Generated on 96 individuals of *Encholirium spectabile* species complex

Marker type	Primer designation	Sequence 5' - 3'	Total number of Polymorphic Loci
ISSR	886	VDV(CT) ₇	15
	887	DVD(TC) ₇	14
	844	(CT) ₈ RC	11
	855	(AC) ₈ YT	12
	864	(ATG) ₆	11
	884	HBH(AG) ₇	5
DAF	OP-V6	ACGCCAGGT	8
	OP-X04	CCGCTACCGA	8
	OP-W17	GTCCTGGGTT	8
	OP-T15	GGATGCCACT	7
	Total		92

Table 2 – Within population indexes for each population. Northern populations presents more polymorphisms than southern populations.

Population	Origin	n	Pedicells	Polymorphic loci %	H _e	sd±
IFG	Petrolina - PE	10	long	0.69148	0.27807	0.22232
FPL	Jaguarari - BA	10	long	0.71276	0.30723	0.21747
SOB	Sobradinho - BA	10	long	0.59574	0.24409	0.22342
CSF	Canindé do S. Francisco - SE	10	long	0.44680	0.17447	0.20936
BMD	Brejo da Madre de Deus - PE	10	long	0.63829	0.25386	0.22210
CUP	Cupira - PE	10	long	0.59574	0.24522	0.22794
LBD	Morro do Chapéu - BA	10	short	0.54255	0.21005	0.22015
JAC	Jacobina - BA	10	short	0.53191	0.21277	0.21957
JEQ	Jequié - BA	6	short	0.37234	0.22872	0.25356
NORT		60	long	0.61347	0.33133	-
SOUTH		26	short	0.48226	0.25166	-
Whole sampling		86	-	-	0.34170	-

Table 3 - Pairwise distances and geographic distances between populations, no correlation between the two tables are found. The values were in the most considerable.

	JAC	LBD	JEQ	SOB	FPL	IFG	CUP	CSF	BMD
JAC	X	62	239	206	125	200	571	325	561
LBD	0.30576	X	304	212	130	218	633	383	616
JEQ	0.26526	0.31817	X	498	415	498	739	518	752
SOB	0.56971	0.43378	0.51232	X	75	33	536	315	507
FPL	0.46781	0.44112	0.44956	0.23767	X	88	551	312	528
IFG	0.43693	0.36258	0.33168	0.27364	0.16992	X	505	280	472
CUP	0.45253	0.30575	0.44543	0.2890	0.29917	0.28147	X	249	61
CSF	0.56969	0.49707	0.58842	0.38660	0.41759	0.41770	0.37381	X	241
BMD	0.47546	0.39476	0.49438	0.38397	0.33960	0.31034	0.09623*	0.42756	X

* Not considerable genetic differentiation

Table 4 – AMOVA results for different levels and ϕ_{st} for each population. The major differentiation is found within population.

Source of Variation	Φ statistics			Differentiation (%)		
Among regions	$\Phi_{ct}=0.16174$	North	South	16.17	North	South
Among populations	$\Phi_{sc}=0.25818$	-	-	21.64	21.84	26.14
Within populations	$\Phi_{st}=0.37816$	$\Phi_{st}=0.21840$	$\Phi_{st}=0.26142$	66.26	78.16	73.86

CONCLUSÕES

- O complexo *E. spectabile* apresenta pouca diferenciação entre suas populações. Apenas dois grupos genéticos foram identificados apresentando um padrão geográfico claro.
- Os marcadores DAF e ISSR foram eficientes na detecção da diversidade e estrutura genética de *E. spectabile* gerando bandas informativas em nível inter e intrapopulacional.
- A homogeneização genética entre as populações indica que os caracteres morfológicos que apresentam variação em *E. spectabile* não são fortes o suficiente para interpor barreiras reprodutivas. Considera-se que a geitonogamia possa ocorrer,

de modo que mesmo populações que historicamente apresentam variações morfológicas, tratam-se da mesma espécie. Tal fato indica que caracteres morfológicos menos plásticos devem ser utilizados pelos taxonomistas para melhor descrever cada espécie.

- Devido à grande similaridade genética e o padrão de distribuição aleatório das populações no espaço geográfico, nenhuma correlação entre as matrizes de distância genética e geográfica foi evidenciada.
- Apesar de não se conhecer o polinizador efetivo de *E. spectabile* a estruturação genética apresentada aponta para um papel efetivo de abelhas e morcegos, já anteriormente reportados como visitantes florais.
- Ações de conservação da espécie *E. spectabile* devem considerar a manutenção de espécimes *in situ*.

Plant Biology

©German Botanical Society and the Royal Botanical Society of the Netherlands



Edited By: Heinz Rennenberg and J.T.M. Elzenga

Impact Factor: 2.395

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2011: 54/190 (Plant Sciences)

Online ISSN: 1438-8677

Author Guidelines

Downloads: [Copyright Assignment Form](#), [Colour Work Agreement Form](#), [Page Charge Form](#).

Supplementary Material: Authors are encouraged to provide additional information as supplementary material that will be accessible online. Please identify the supplementary material as such in the manuscript.

Editorial

Policy

Plant Biology publishes research results from all fields of plant science. Manuscripts must be of general interest, not only addressed to a specialized readership. The journal encourages publications with an interdisciplinary approach.

Plant Biology accepts

1. Problem-oriented original research papers (maximum 9000 words)
2. Problem-oriented short research papers (maximum five printed pages)
3. Concise review articles

4. Acute views, i.e., comments on actual problems and provocative opinion articles. Purely descriptive papers will not be accepted. The Editors welcome contributions from all over the world.

Submission of Manuscripts
Please submit your manuscript online at [ScholarOne Manuscripts](http://mc.manuscriptcentral.com/plabio) (*Plant Biology* no longer accepts submissions made by post or e-mail).

To submit a manuscript through ScholarOne Manuscripts, please follow these instructions:

1. If you do not yet have an account, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/plabio> and click on 'Create Account'. You will then be sent a password by e-mail. If you already have an account, enter your user ID and password and click on 'Log In'. (Note: if necessary you can change your password under 'Edit My Account'.)
2. On the welcome page, click on 'Corresponding Author Center'.
3. You then reach the 'Author Center Dashboard', click on the star icon for manuscript submission.
4. Follow the steps 1-7 until manuscript submission is completed. The main document including title, abstract, key words (MS Word file), tables (MS Word files) and figures (*.eps, *.tif or *.jpg files) are loaded onto the system as individual files. The text should be written double spaced and with line numbering. (Note: you may also interrupt the online submission and continue at a later time.) Authors are encouraged to provide additional information as Supporting Information that will be accessible online.
5. **Fast-Track Publication:** *Plant Biology* offers special handling of manuscripts that have been rejected from very high-level journals. Authors are encouraged to enclose the original manuscript, the reviews plus the comments from the editor, and the revised manuscript of previously reviewed manuscripts to expedite their handling as your manuscript may be accepted based on the previous reviews. Please also include a letter with a point by point response to the concerns raised by the reviewer(s). You will receive a final decision from the Managing Editor within a few days of submitting manuscripts with reviews.
6. Authors should address the following points in their cover letter. 1. What are the aims and hypothesis of their paper?; 2. What new achievements or innovations do they present?; 3. What is the general significance of their paper and why is it timely?
7. Submission of your manuscript will be confirmed by an e-mail that will give you the 'Manuscript ID Number'. Please refer to this number in all correspondence with the editorial office. With your submission, you guarantee that all co-authors agree with the submission of the manuscript.

Should you encounter difficulties submitting a manuscript to ScholarOne Manuscripts, please contact the editorial office by e-mail at annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone ++49(0)761/203-8300. Help is also available on the introductory page of ScholarOne Manuscripts in the form of an 'Online User's Guide'. To access the guide, click on 'Get Help Now' in the top right-hand corner.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check

the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Conditions for Publication

Research papers may be submitted that have not been published previously, even as a summary. Concise presentation is required. Although the non-specialist reader should be kept in mind when abstracts, introductions and discussions are written, lengthy review type introductions and speculative discussions should be avoided. Experimental methods should be explained in detail except for standard procedures. Diffuse and repetitive style should be avoided. Illustrations and tables should be limited to the truly essential material.

Plant Biology preferentially publishes **short research papers** (five printed pages maximum) that will be reviewed with high priority.

Concise review articles that synthesize the state of the art in an original way are highly desirable for this journal.

Acute views contributions should contain brief comments on an actual problem (2-3 printed pages).

CrossCheck for plagiarism: All submissions will be run through CrossCheck to identify any plagiarism. If an author is found to have plagiarized all or parts of his or work, the author's institute will be notified of the breach of scientific conduct.

New: Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscripts professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Length of Papers

Papers should not exceed 8 printed pages or 9,000 words. One printed page in the journal (without figures and tables, with about 3 subheads and paragraphs) usually contains roughly 6200 characters. The number of figures plus tables should not exceed 9. Appendices will be published as Supporting Information rather than in the main text.

References: About 40 to 50 references usually fill one printed page.

Page Charges: Original research papers longer than the guidelines given above when in proof are subject to a page charge at a rate of €125 per page above the 8-page limit (first 8 pages are free of charge). An invoice will be sent to authors for these charges upon print publication of their article. Invited and review articles are excluded from this rule.

Arrangement

Research papers

Title page: The first page of each paper should indicate: The title, the authors' names

and affiliations, a short title for use as running head, the name, address, e-mail address, phone and fax number of the corresponding author, and 3 to 7 keywords. *Abbreviation:* List with abbreviations where appropriate. *Abstract:* The abstract must not exceed 250 words. It should include the hypothesis, explain the novelty of the work, and what it adds to the body of scientific knowledge. The following sections cover the usual contents: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References (see below), Tables (see below), Figure legends (see below), Illustrations (see below). In Materials and Methods, Results and Discussion subheadings are possible. If an author chooses to combine sections Results and Discussion, an additional section Conclusions can be added, but this must be brief.

Concise review articles
Choose subheadings as appropriate but do not use a numbering system. Title page, Key words, Abstract and other items as for full length papers.

Tables

Tables must be serially numbered in Arabic numerals and each must carry a brief descriptive heading. Tables reproduced from other publications must state their precise source. Only signs that can be typeset should be used in the tables and legends. Please provide Tables in Word and include them at the end of the manuscript after the References, each on a separate page. Refrain from using both tables and graphs to demonstrate the same results.

Figures and Graphics
Electronic artwork

It is essential that all artwork is provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Post-script (EPS) format and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image Format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Please do not embed any tables and/or figures in the text document. If you should encounter difficulties upon submitting figures and graphics, please contact the editorial office by e-mail under annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone under ++ 49/(0)761/203-8300.

Colour illustrations: Authors are required to cover the cost of colour printing. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a [colour work agreement form](#) before your paper can be published. Colour printing costs €300 per article + VAT. Please supply colour work as eps, tiff or jpg files. The colour work form can be downloaded as a PDF from the internet. [To download PDF files you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://get.adobe.com/uk/reader>.

All completed forms should be addressed to the Production Editor at the following address:

Plant
Wiley-Blackwell

Biology

Please address any queries in relation to colour reproduction to plb@wiley.com.

References

The list of references must include all (but no additional) references quoted. Arrange references alphabetically according to author name, not chronologically. The name of the journals containing the cited papers should be given in full. Town/city and country names should be provided for non-journal refs. Each article reference should be given as in the following example:

Alfano J.R., Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annual Review Phytopathology*, **42**, 385–414.

Books or other non-serial publications which are quoted in the references must be cited as follows:

Gage J.D., Tyler P.A. (1991) *Deep-sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep-sea Floor*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 504 pp.
Lester R.N., Hasan S.M.Z. (1991) Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. In: Hawkes J.G., Lester R.N., Nee M., Estrada N. (Eds), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew; London, UK: 369–387.

Articles not yet published may only be cited if they have definitely been accepted for publication. They must be denoted by the expression 'in press'.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Units

Plant Biology will follow the system of SI units (Système International d'Unités). Within a given paper chosen units must be uniform.

Abbreviation

Note that common abbreviations can be used without explanation. Others must be explained. In case of doubt always give an explanation. Use FW = fresh weight and DW = dry weight.

Scientific

Names

Scientific names should be cited in their complete form when first mentioned with genus - species - authority - cultivar (cv.) or subspecies (ssp.) where appropriate. Latin names should be underlined or typed in *italics*. Subsequently the generic names should be abbreviated, but avoid confusion: e.g. use *A. comosus* if the only genus with a first letter A in your paper is *Ananas*; but use unambiguous abbreviations if you have more than one genus with the same first letter, e.g. *Ananas comosus*, *Aechmea nudicaulis* = *A. comosus*, *Ae. nudicaulis*, etc. Common names of organisms must be accompanied by the correct scientific name when first mentioned. For rare or exotic genera it may be

useful to give the name of the family and/or higher taxon in brackets when first mentioned.

Copyright

Authors will be required to assign copyright of their paper to the German Botanical Society, Royal Botanical Society of the Netherlands and Blackwell Publishing. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright should tick box 3 on the form). Download the [Copyright Assignment Form](#) here. The publishers will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce their contributions to the journal.

Reprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. The corresponding author will be asked to provide up to seven email addresses for early distribution of a PDF offprint by the publisher. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for the printed offprints to take up to 8 weeks to arrive after publication of the journal. For further information please contact C.O.S. Printers PTe Ltd, 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; E-mail: offprint@cosprinters.com.

Author

material

archive

policy

Please note that unless specifically requested, the Publisher will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible after the final decision about publication.

Production

You will receive a proof of your article approximately 4 weeks after acceptance. The proof will contain instructions on how to return corrections and answers to the queries listed at the end of the proof. Please note that the journal does not accept e-annotated PDFs. Please submit hand-written or typed modifications only.

Last update: February 2013

ANEXO 2

RESUMO APRESENTADO NO X ALAG – Viña del Mar, Chile, 2010.



XIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENÉTICA (ALAG)
VIII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MUTAGÉNESIS, CARCINOGENESIS Y
TERATOGENESIS AMBIENTAL (ALAMCTA)
XLIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD DE GENÉTICA DE CHILE (SOCHIGEN)
XXXIX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA (SAG)

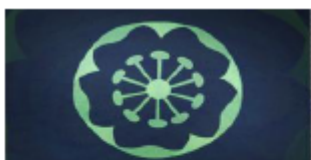
RESUMEN 184

SELEÇÃO DE PRIMERS PARA A AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Encholirium spectabile* Mart ex Schult. USANDO DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING). (Primer selection for the evaluation of the genetic diversity in *Encholirium spectabile* Mart ex Schult. using DAF (DNA Amplification Fingerprinting).) Gonçalves-Oliveira, R.C., Santos-Filho, J.M., Pinangé, D.S.B., Cruz, G.A.S., Alves, M., Benko-Iseppon. Universidade Federal de Pernambuco. Brasil.
rod.biogen@gmail.com

Genetic characterization of communities is important to reveal population evolutionary history. Molecular markers have been largely used to access genetic variability on species populations and as a tool for ecological approaches. DAF Primers are random like RAPD, being highly accurate and reliable. This work aimed to select polymorphic DAF primers to access the variability of *Encholirium spectabile* populations, a Bromeliaceae genus largely represented in the Brazilian semi-arid regions. Four samples from two native populations were used for the primer selection step. Twenty-five DAF primers were evaluated, with polymorphisms plotted on a binary matrix and loaded on the MEGA4.1 program to generate phenograms. Nineteen primers generated 250 loci, from which 101 at the interpopulational and 133 at the intrapopulacional level. The generated tree clustered each population in its own branch. The ten more informative primers (V03, V06, V07, V15, W05, W06, W17, Y06, Y18, X04) corroborated this result and will be important for future genetic population studies targeting the management and conservation of *E. spectabile* populations.

ANEXO 3

RESUMO APRESENTADO NO 62.º CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA – Fortaleza, Ceará, 2011.



62º Congresso Nacional de Botânica

Botânica e Desenvolvimento Sustentável

34ª Reunião Nordestina de Botânica

7 a 12 de agosto de 2011

SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE DAF E ISSR EM *DICKYA* *MACEDO* L. B. SMITH, *D. PERNAMBUCANA* L. B. SMITH E *ENCHOLIRIUM SPECTABILE* MART. EX. SCHULT (PITCARNIOIDAE, BROMELIACEAE) PARA ESTUDOS POPULACIONAIS

RODRIGO CÉSAR GONÇALVES DE OLIVEIRA

Co-autores: RODRIGO C. GONÇALVES-OLIVEIRA, DIEGO S. B. PINANGÉ, JOSÉ M. SANTOS-FILHO, MARCCUS V. ALVES e ANA M. BENKO-ISEPPON

Tipo de Apresentação: Pôster

RESUMO

SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE DAF E ISSR EM *Dickya macedoi* L. B. Smith, *D. pernambucana* L. B. Smith e *Encholirium spectabile* Mart. ex. Schult (Pitcarnioidae, Bromeliaceae) PARA ESTUDOS POPULACIONAIS (1).

Rodrigo C. Gonçalves-Oliveira(2,3)

Diego S. B. Pinangé (2,3)

José M. Santos-Filho (3)

Marccus V. Alves (4)

Ana M. Benko-Iseppon (2,3)

Dickya e *Encholirium* são gêneros derivados entre as Bromeliaceae brasileiras, possuindo espécies que são comumente encontradas nos afloramentos rochosos ou em solos bastante rasos, principalmente nos domínios do Cerrado, Caatinga e Floresta Atlântica. Os representantes desses gêneros são ótimos modelos para estudos populacionais, especialmente em inselbergues, as conhecidas ilhas terrestres. *D. macedoi*, *D. pernambucana* e *E. spectabile* são espécies bastante difundidas em afloramentos rochosos, tendo sido selecionadas para o presente estudo. O presente estudo objetivou a seleção de oligonucleotídeos com fins de estudos populacionais. O DNA vegetal foi extraído a partir de folhas jovens de indivíduos coletados em afloramentos rochosos do Nordeste. 50 *Primers* de DAF e ISSR foram testados em ambas as espécies gerando marcas polimórficas intrapopulacionais em *Dickya*, sendo 77 polimorfismos de ISSR para *D. macedoi* (de um total 254 *loci*) e 33 polimorfismos referente às marcas DAF (de um total de 80 *loci*). Para *D. pernambucana* encontraram-se 190 *loci* de ISSR sendo 86 polimórficos e 67 de DAF, sendo 43 polimórficos. Por sua vez, em *E. spectabile*, foram amplificados 250 *loci* de DAF sendo 133 em nível interpopulacional e 101 em nível intrapopulacional. Das 112 marcas geradas por ISSR 49 foram polimórficas em nível intrapopulacional e 84 em nível interpopulacional. Dos oligonucleotídeos testados em *Dickya* 39% não apresentaram amplificação satisfatória ou falharam em alguma amostra. O percentual de falhas em *Encholirium* foi de 40%. Os dez melhores *primers* de cada marcador foram selecionados por espécie. No geral os marcadores DAF e ISSR apresentaram até 75% de polimorfismos interespecíficos e 64% intraespecíficos, indicando que estes *primers* são promissores para utilização em projetos de genética de populações com as espécies relacionadas.

ANEXO 4

Amplificação heteróloga de SSR desenvolvido para Bromeliaceae em *Encholirium spectabile*

Rodrigo C. Gonçalves-Oliveira, Clarisse Palma-Silva e Ana M. Benko-Iseppon.

1. Introdução

Encholirium spectabile é uma espécie da família Bromeliaceae restrita e endêmica a afloramentos rochosos do Nordeste brasileiro, sendo considerada como elemento mais característico desses ambientes (GOMES & ALVES, 2009). Além disso, *E. spectabile* apresenta uma grande plasticidade morfológica em caracteres comumente utilizados para a delimitação taxonômica de espécies, de modo que vários binômios tem sido descritos em diferentes regiões do Nordeste brasileiro (FORZZA, 2005). Marcadores microssatélites são a opção mais adequada para estudos populacionais em plantas nativas, entretanto o seu desenvolvimento demanda tempo e gera custos operacionais. Contudo marcadores desenvolvidos para espécies próximas podem apresentar transferabilidade reduzindo assim os custos operacionais como realizado por Palma-Silva *et al.* (2007).

2. Materiais e Métodos

Espécimes de *E. spectabile* foram coletadas na população de Canindé do São Francisco (CSF) (2 indivíduos) e Brejo da Madre de Deus (BMD) (2 indivíduos) em tampão CTAB-NaCl segundo Rogstad *et al.* (1992). A extração de DNA seguiu-se segundo Weising *et al.* (1995) com alterações no volume de tampão CTAB para 7ml por tubo, e apenas uma única lavagem com CIA. O DNA foi purificado de polissacarídeos e tratado com RNase (MICHAELS *et al.*, 1994). As reações de amplificação heteróloga com foram realizados com 12 primers previamente descritos para, *Tillandsia fasciculata* Sw., *Guzmania monostachya* Rusby, *Pitcairnia geyskesii* L. B. Sm., *Alcantarea imperialis* Harms e *Vriesea gigantea* (BONEH *et al.*, 2003; SARTHOU *et al.*, 2003; PALMA-SILVA *et al.*, 2007) (Tabela 1). As reações se

seguiram em programa Tutchdown em termociclador Applied Biosystems contendo 1x Fermentas TAQ Buffer, 1 mM Fermentas MgCl₂, 10 mM Fermentas dNTP, 10 pmol de cada primer, 1pmol do primer marcado M13, 2U de TAQ Fermentas e DNA alvo na concentração de 5ng/ul. O programa de amplificação seguiu-se de uma pré-desnaturação de 3 min a 95° C seguindo-se de 10 ciclos contendo as etapas de desnaturação a 94° C por 30 seg, anelamento a 48° C seguindo do aumento em 1° C a cada ciclo por 30 seg e extensão final a 72° C por 30 seg. O programa seguiu com o segundo set de ciclos sendo 30 ciclos contendo as etapas de desnaturação a 94° C por 30 seg, anelamento a 48° C por 30 seg e extensão final a 72° C por 30 seg. Além dessas etapas uma extensão final a 72° C por 10 seg. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1% e posteriormente genotipado em seqüenciador ABI 1900 e os eletroferogramas analisados no programa GeneMarker V.1.95 DEMO.

3. Resultados

Todos os *primers* testados apresentaram amplificação satisfatória quando visualizados em gel de agarose, entretanto o número de polimorfismos evidenciado foi baixo conforme apresentado na Tabela 1. Apenas dois *primers* PaB12 e PaD07 apresentaram-se polimórficos, outros seis apresentaram-se monomórficos e três deles inespecíficos.

4. Discussão

A amplificação heteróloga de primers já foi realizada anteriormente para algumas espécies de Bromeliaceae por Pama-Silva *et al.* (2007) com sucesso, entretanto só foram verificados a possibilidade de amplificação, não de polimorfismos. O fato de apenas os primers PaB12 e PaD07 terem amplificado e serem polimórficos em *E. spectabile* deve estar relacionado ao fato desses *primers* serem desenvolvidos para *Pitcairnia albiflos*, uma espécie da mesma subfamília que *Encholirium*. Desse modo chegamos a conclusão que a amplificação heteróloga de microssatélites é possível, contudo isso devera ocorrer apenas com espécies mais aparentadas filogeneticamente.

Tabela 1 – Amplificação de *primers* de Bromeliaceae em *Encholirium spectabile*, Sequencia, Tamanho do Locus, Cor utilizada para Genotipagem, Status da Amplificação e Resultado Final.

Primer	Sequência	Tam Locus	Cor	Amplificação	Resultado
VgA04	F: CAAACCCTTCTCACCTCACC R: CGACTCACCTGGCCCTAAT	187 – 215	FAN	Ok	Monomórfico
VgC01	F: GCTAGGGTTTCACCCCAAAT R: TCAGCCTCTGATCCATCTCC	208 – 218	VIC	Ok	Monomórfico
VgF02	F: TTACACCTGCCTACCCCTTG R: TTGGAGATCAAAACCCGAAG	176 – 204	NED	Ok	Monomórfico
Ai4.03	F: TGGCTTGTGGAGTTCTCACT R: AACAAGGAGGTTGATCAAGAGG	192 – 195	PET	Ok	Monomórfico
PaA10	F: AACCATTGACATCCGCTGTT R: CTTCGGAAGCTCCTCTGGAT	146 – 149	NED	Ok	Monomórfico
PaB12	F: AGAGGCTGAGAGAGGTAAACCA R: CGAGCCCTCTTTCTGAACC	219-280	FAN	Ok	Polimórfico
PaC05	F: CCCGAGGGACATTCTCTCTT R: CATGGCGCAGTAGTGTTTTT	149 – 153	FAN	Ok	Inespecífico
PaD07	F: TCGATGTGCGCGGTAGTGAG R: TCCTCTCGCTTTGATTACCC	233 - 239	NED	Ok	Polimórfico
PaZ01	F: TCCATGTGCCTCATCATAGC R: TGCCCACAAAGCATATCAGT	185 - 199	VIC	Ok	Inespecífico
e19	F: TCTTACTGCTCTCCATTGGT R: ATTTTTGGTGTTGCAGATGT	137	VIC	Ok	Inespecífico
e6b	F: CGTACGAAGGTAAGCACAA R: CCGTTGAAGAGGTTAGAGG	151	PET	Ok	Inespecífico
CT5	F :AATGAGTTTCAGTTTTAGAAAGC R: CCAAGAAAAGAACGGATCA	190-240	FAN	Ok	Monomórfico

5. Referências

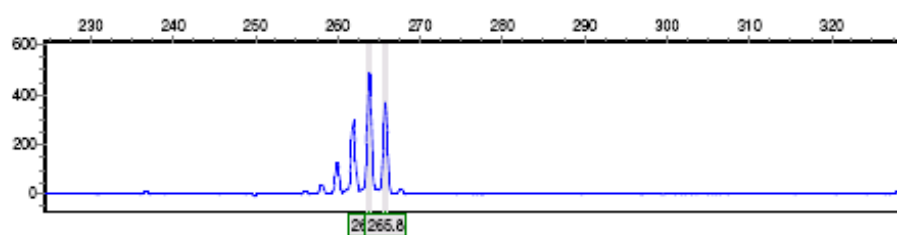
- BONEH, L.; KUPERUS, P.; TIENDEREN, P. H. V. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. *Molecular Ecology Notes*, v.3, 302 – 303, 2003.
- FORZZA, R. C. Revisão Taxonômica de *Encholirium* Mast. Ex Schult & Schult. F. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v.23, 1, p.1 – 49, 2005.
- MICHAELS, S. D., JOHN, M.C.& AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plants DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques*, v.17, p. 274-276, 1994.
- PALMA-SILVA, C.; CAVALLARI, M. M., BARBARÁ, T.; LEXER, C.; GIMENES, M. A.; BREED, F.; BODANESE-ZANETTINI, H. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*, v.7, 654 – 657, 2007.
- ROGSTAD, S. H. Saturated NaCl-CTAB Solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon*.v.41, p.701 – 708, 1992.
- SARTHOU, S. BOSSELIER-DUBAYLE, C. M. LAMBOURDIERE, J.; SMADI, S. Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. Smith (Bromeliaceae). A specific saxicolous species of inselbers in French Guiana. *Molecular Ecology Notes*, v.3, p.221 - 223, 2003.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., MEYER, W. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRS Press, Boca Raton. 1995.

ANEXO 5

Allele Report da seleção de primers de SSR.

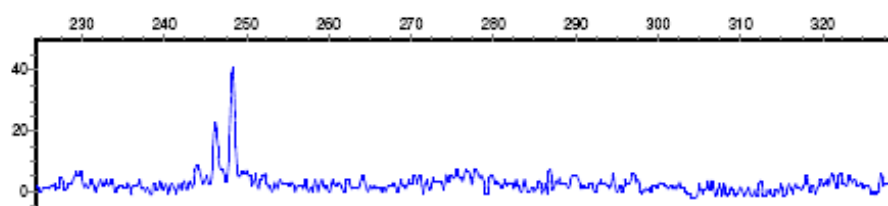
Sample 1:

Dye: Blue - 13 peaks - RO-EF02-B12-01.fsa



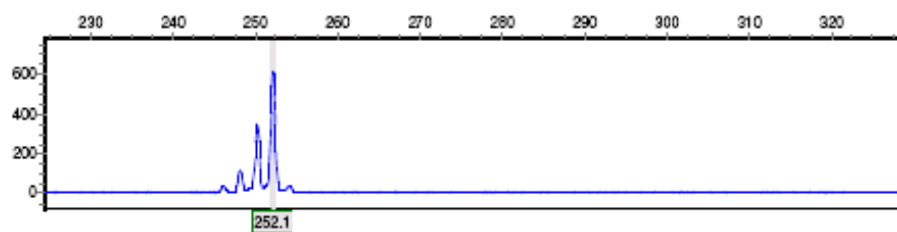
Sample 2:

Dye: Blue - 19 peaks - RO-EF02-B12-02.fsa



Sample 3:

Dye: Blue - 13 peaks - RO-EF02-B12-03.fsa



Sample 4:

Dye: Blue - 28 peaks - RO-EF02-B12-04.fsa

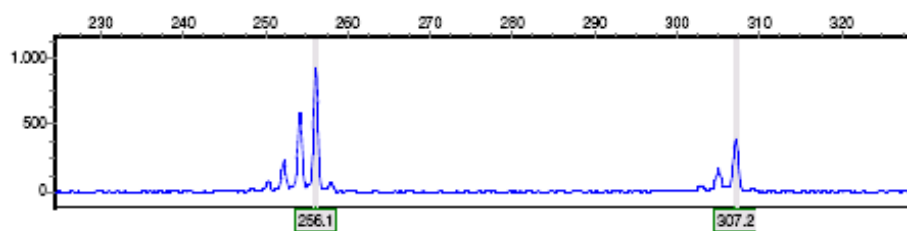
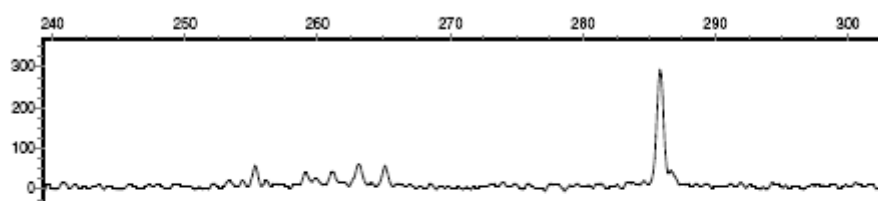


Figura suplementar 1 – Resultados de polimorfismos visualizados no programa GeneMark 1.95 para o primer PaB12.

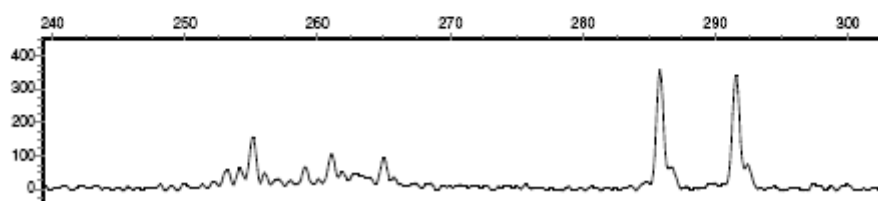
Sample 1:

Dye: Yellow - 80 peaks - RO-C-C01-A10-B12-D07-E19-01/1sa



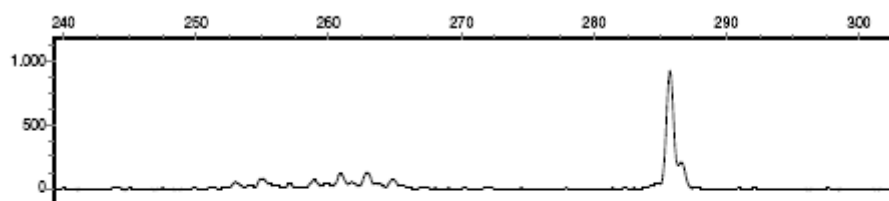
Sample 2:

Dye: Yellow - 44 peaks - RO-C-C01-A10-B12-D07-E19-02/1sa



Sample 3:

Dye: Yellow - 47 peaks - RO-C-C01-A10-B12-D07-E19-02/1sa



Sample 4:

Dye: Yellow - 41 peaks - RO-C-C01-A10-B12-D07-E19-04/1sa

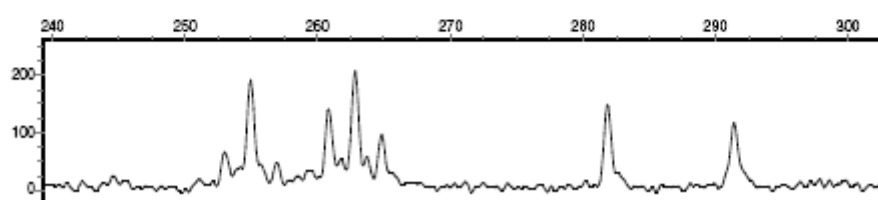


Figura suplementar 2 - Resultados de polimorfismos visualizados no programa GeneMark 1.95 para o primer PaD07.

ANEXO 6

Figura Suplementar

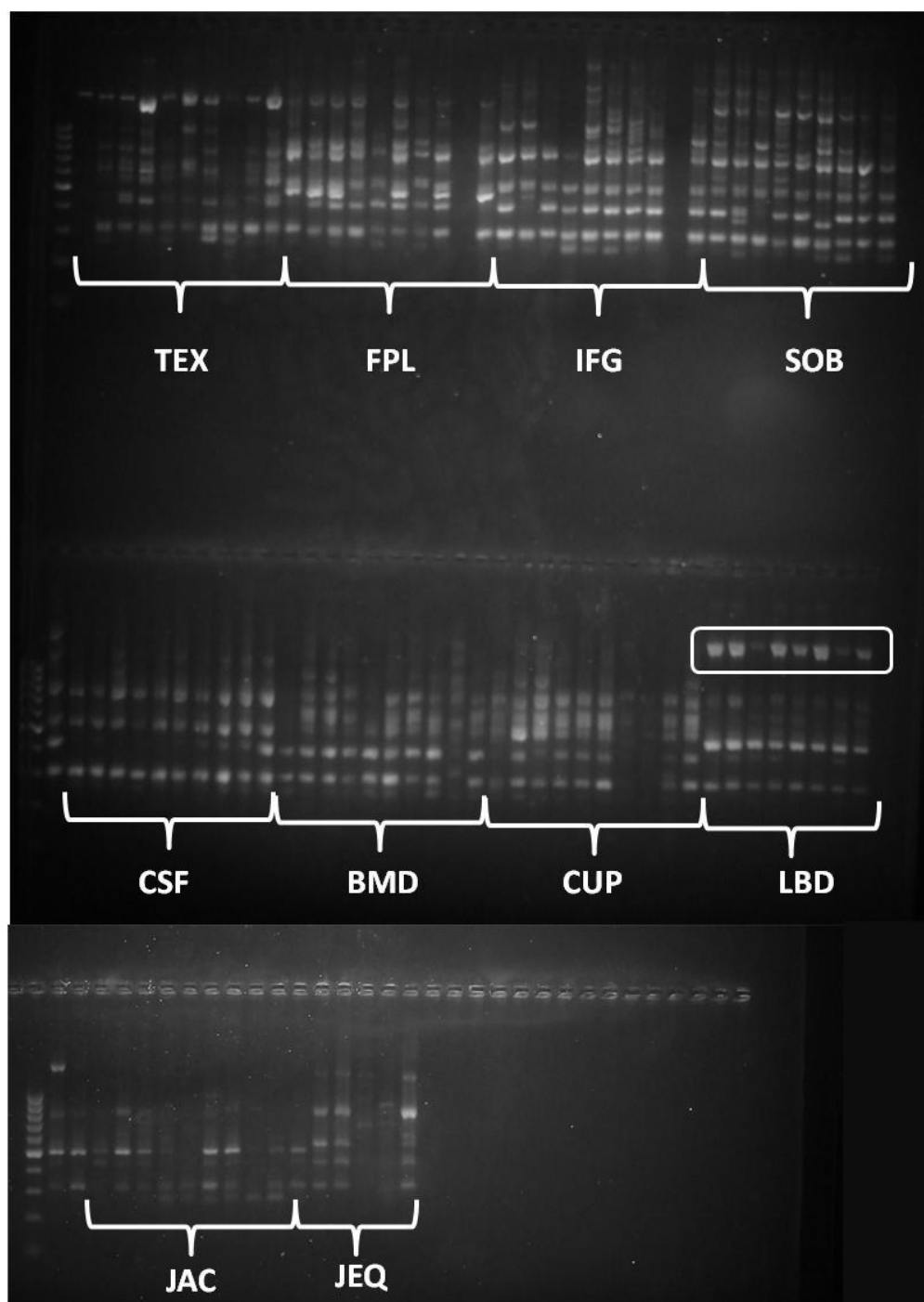


Figura Suplementar 3 – Gel de Agarose mostrando loci do primer DAF - OP-X04. Em detalhe polimorfismo na população LBD.

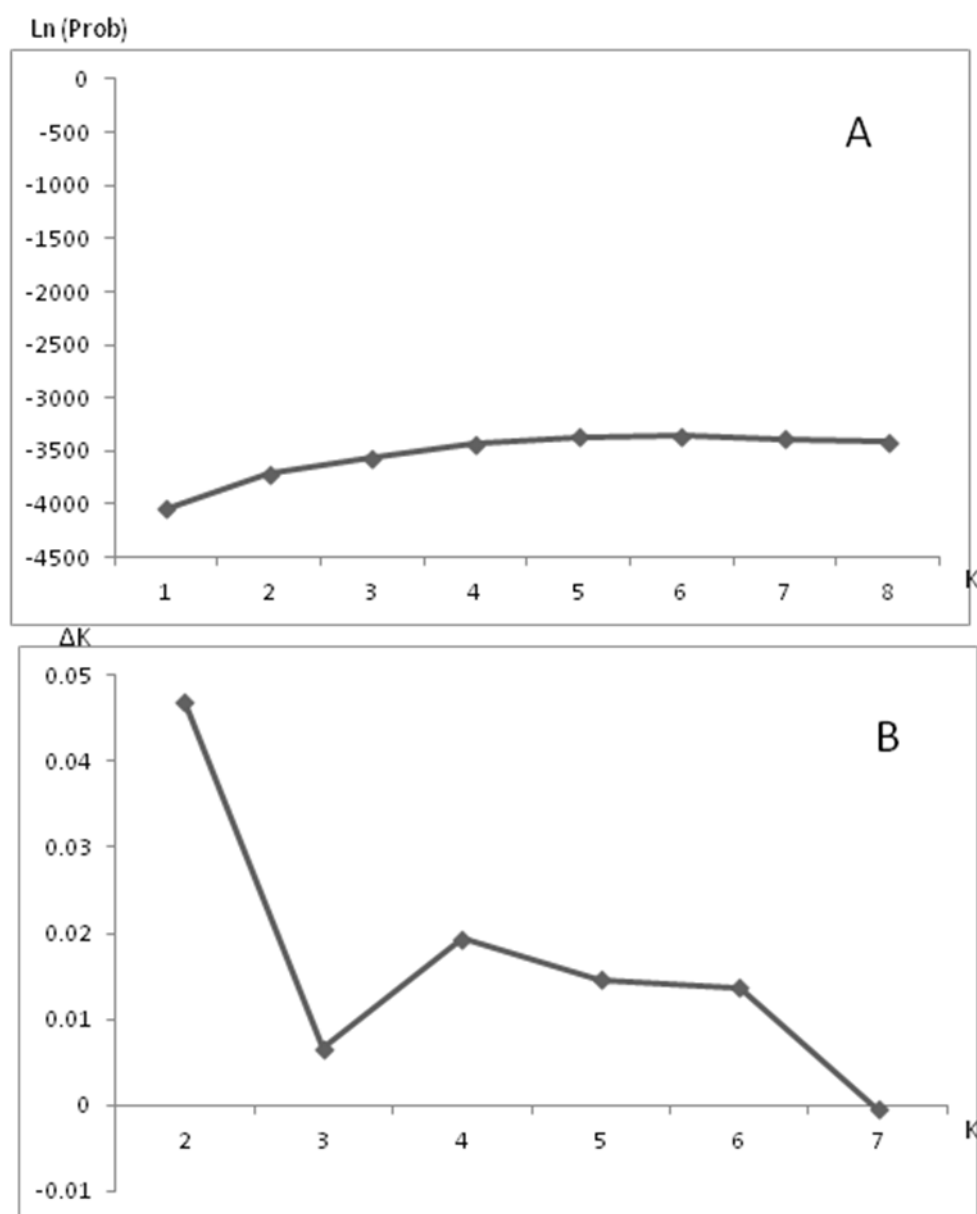


Figura suplementar 4 – Resultados obtidos no Programa STRUCURE. A – gráfico de K x Ln(Prob), o valor inicia sua estabilização em k=3 . B – Correção de Evvano, K = 4 foi escolhido.

ANEXO 7

Tabelas Suplementares

Tabela suplementar S1 . Seleção de *primers* de ISSR em *Encholirium spectabile*.

Primer	Sequência	Total de Bandas	Polimorfismos		Polimorfismos intrapopulacioanis em:	
			Intrapopulacionais	Interpopulacionais	FPL	BMD
856	(AC) ₈ YA	18	8	15	3	5
826	(AC) ₈ C	15	6	14	6	0
835	(AG) ₈ YC	14	9	12	4	5
887	DVD(TC) ₇	12	1	8	1	0
855	(AC) ₈ YT	11	4	7	0	4
836	(AG) ₈ YA	10	3	8	3	0
886	VDV(CT) ₇	8	1	4	1	0
864	(ATG) ₆	7	4	5	3	1
851	(GT) ₈ YG	6	6	4	2	4
844	(CT) ₈ RC	5	3	3	1	2
853	(TC) ₈ RT	5	3	3	1	2
818	(CA) ₈ G	3	1	1	0	1
TOTAL		114	49	84	25	24

Tabela suplementar S2 . Seleção de *primers* de DAF em *Encholirium spectabile*.

Primer	Sequência	Total de Bandas	Polimorfismos		Polimorfismos intrapopulacioanis em:	
			Intrapopulacionais	Interpopulacionais	FPL	BMD
V 15	CAGTGCCGGT	15	10	4	6	4
V 06	ACGCCCAGGT	22	28	9	19	9
W 03	GAAGCCAGCC	6	4	2	3	1
V 08	GAAGCCAGCC	9	6	0	2	4
C 14	TGCGTGCTTG	10	6	3	3	3
R460 -2	GCAGGATACG	7	2	4	0	2
T 15	GTCCTGGGTT	10	6	3	6	0
H 1	GGTCGGAGAA	11	3	5	1	2
A 12	TCGGCGATAG	7	1	4	0	1
W 05	GGCGGATAAG	10	11	2	7	4
V 03	CTCCCTGCAA	17	22	1	9	13
W 08	GACTGCCTCT	7	2	2	2	0
V 07	GAAGCCAGCC	17	4	7	0	4
W 06	GACTGCCTCT	14	4	6	2	2
Y 17	GACGTGGTGA	18	7	8	2	5
X 04	CCGCTACCGA	23	6	13	1	5
Y 06	AAGGCTCACC	14	2	8	1	1
W 17	GTCCTGGGTT	20	3	14	3	0
Y 18	GTGGAGTCAG	13	6	6	3	3
TOTAL		250	133	101	70	63