

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

VITOR DA CUNHA MANHÃES

**ESTUDOS EM *Pitcairnia azouryi* (BROMELIACEAE),
UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DE INSELBERGUES
DA FLORESTA ATLÂNTICA**

**Alegre, ES
Fevereiro de 2015**

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

**Estudos em *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), uma
espécie endêmica de inselbergues da Floresta Atlântica**

Vitor da Cunha Manhães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Genética e Melhoramento na Área de Biologia Evolutiva e Citogenética.

Orientador: Dra. Tatiana Tavares Carrijo

Coorientador: Dr. Fábio Demolinari de Miranda

**Alegre, ES
Fevereiro, 2015**

Estudos em *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica de inselbergues da Floresta Atlântica

Vitor da Cunha Manhães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Genética e Melhoramento na Área de Biologia Evolutiva e Citogenética.

Aprovada:

Prof.^a. Dr.^a. Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)

Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co-orientador)

Prof. Dr. Mário Luís Garbin
Universidade Vila Velha
(Membro Externo ao programa)

Aos meus pais, irmãos e sobrinha dedico...

“Não nos surpreendemos com a raridade de uma espécie, mas ficamos chocados com o seu desaparecimento; é como admitir que a doença é o prelúdio da morte e não se sentir surpreso diante da doença, mas apenas com a morte da pessoa doente, não atribuindo o falecimento ao mal de que ela sofria, mas a algum ato desconhecido de violência.”

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela infraestrutura oferecida;

À minha querida orientadora Dra. Tatiana Tavares Carrijo, pela confiança empregada neste projeto desde o seu planejamento, e a quem devo muitos dos meus conhecimentos. Pelo carinho, amizade, conselhos, críticas e palavras de incentivo, paciência e pela divertida companhia nas coletas. Muito Obrigado!

Ao meu coorientador Dr. Fábio Demolinari de Miranda, pelos grandes ensinamentos e por ter acreditado nesta empreitada, e pelo suporte laboratorial fornecido;

Ao Dr. Wellington Ronildo Clarindo pela colaboração, sem o qual o trabalho de citogenética não seria possível;

À UFV por disponibilizar a infraestrutura necessária para as análises de citometria de fluxo;

Ao amigo Dayvid Rodrigues Couto, pela parceria, grande incentivo, conselhos, sugestões e pela ajuda nas divertidas coletas de materiais botânicos;

Ao Dr. Thiago dos Santos Coser, pelos conselhos e na decisão da espécie a ser trabalhada;

Ao Dr. Mário Luís Garbin pelas importantes críticas no decorrer do projeto e pelo suporte nas metodologias de coleta de dados;

Aos Sr. Damaceno (Sena), Sra. Lourdes, Sr. Ezequiel Porto, Sr. José Evaldo e Sr. Gilmar Araújo proprietários das localidades onde estão inseridos os inselbergues, por permitirem a execução deste trabalho nessas localidades e por nos acolher da melhor forma possível em diversos momentos, Obrigado!

Ao coordenador e funcionários do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento do CCA-UFES;

Aos membros da banca do exame de qualificação Mário Luís Garbin, Fábio Demolinari de Miranda, Márcia Flores da Silva;

Aos professores Maurício Amaral e Dr. José Francisco Amaral pela confiança empregada;

À amiga Amélia Tuler pela ajuda e paciência em diversos momentos, e aos amigos do Laboratório de Botânica e de pós-graduação;

Aos meus Pais José Cleber Manhães e Luzia da Cunha Manhães por todo apoio e incentivo transmitidos durante toda a minha vida.

RESUMO

Este estudo aborda aspectos moleculares e citogenéticos de *Pitcairnia azouryi* Martinelli & Forzza, uma espécie endêmica de inselbergues da Floresta Atlântica através do estudo de suas populações a respeito de sua diversidade genética, da quantidade de DNA nuclear e do número de cromossomos. Amostras de folhas de 13-15 indivíduos foram coletadas em cinco populações entre o sul do ES e norte do RJ, em um total de 66 indivíduos. Nove marcadores microssatélites (SSRs) foram utilizados em PCRs. Os polimorfismos genéticos foram identificados a partir de polimorfismos entre indivíduos amostrados, detectadas por eletroforese em gel de acrilamida 8%. Os parâmetros de diversidade e estrutura genética de populações foram calculados utilizando o software Fstat, PopGene e Structure. A análise de citometria de fluxo foi efetuada utilizando amostras de folhas obtidas a partir de cinco indivíduos adultos de cinco populações distintas. Análises citogenéticas foram realizadas com raízes obtidas a partir de sementes germinadas coletadas em duas populações. Os nove *primers* SSR produziram produtos de amplificação satisfatórios, e provou ser polimórfico. O número de alelos por loco variou entre dois e oito. Os valores do índice de diversidade genética (G_d) e do índice de fixação (F_{is}) em populações variou 0,459-0,578 e 0,047-0,208, respectivamente. Os valores observados F_{st} mostrou que 81,20% da variação genética total é encontrada dentro das populações e a ocorrência de fluxo gênico (Nm) 1,073 (número médio de migrantes por geração). Análise Bayesiana indicaram que um modelo de $k = 3$ populações é capaz de apreender melhor a variação nos dados sobre a estrutura genética. A análise de citometria de fluxo mostrou que o teor de DNA nuclear é $2C = 1,16$ picogramas em todas as populações analisadas, exceto na população PLC, no qual foi medida duas vezes do teor de DNA ($2C = 2,32$ picogramas). A análise citogenética revelou indivíduos com $2n = 50$ cromossomos em ES e indivíduos $2n = 100$ cromossomos no RJ. A alta variação do índice de fixação adicionado à grande variação genética dentro e entre as populações sugerem a ocorrência do efeito fundador na dispersão de novos indivíduos em novos locais, seguido de deriva genética, especialmente para a população de Campos dos Goytacazes. As características encontradas em relação ao conteúdo de DNA nuclear e do número cromossômico podem ser dever ao isolamento geográfico de PLC, ou às características ambientais locais ou à diferentes processos evolutivos.

Palavras-chave: Floresta Atlântica, Biologia da Conservação, Afloramentos Rochosos.

ABSTRACT

This study reports the discovery of new areas of occurrence of *Pitcairnia azouryi* Martinelli & Forzza, and the study of their populations regarding its genetic diversity, the amount of nuclear DNA and the chromosome number. Seven new areas of occurrence for this species were located between the northern state of Rio de Janeiro (RJ) and the southern state of Espírito Santo (ES), and georeferenced to the other studies. Leaf samples of 13-15 individuals were collected in five of these populations (PLB - Pedra Lisa Burarama, PA - Pedra das Andorinhas, PTI - Pedra Três Irmãs, PPC - Pedra Parada Cristal and PLC - Pedra Lisa Campos), totaling 66 individuals. Nine SSR markers were used in PCRs. Genetic polymorphisms were identified from polymorphism between individuals sampled, detected by electrophoresis on acrylamide gel 8%. The parameters of diversity and genetic structure of populations were calculated using the software Fstat, PopGene and Structure. The flow cytometry analysis was performed using leaf samples obtained from adult individuals of five populations. Cytogenetic analyzes were performed with roots obtained from germinated seeds collected in two populations. The nine SSR primers produced satisfactory amplification products, and proved to be polymorphic. The number of alleles per loci ranged between two and eight. The values of gene diversity index (G_d) and the fixation index (F_{is}) in populations ranged from 0.459 to 0.578 and 0.047 to 0.208, respectively. The F_{st} values observed showed that 81.20% of the total genetic variation is found within populations and the occurrence of gene flow (Nm) 1,073 (average number of migrants per generation). Bayesian analysis indicated that a model of $k = 3$ populations is able to better capture the variation in the data on the genetic structure. The high variation of fixation index added to the large genetic variation within and moderate genetic differentiation among populations suggest the occurrence of the founder effect in the dispersion of new individuals in new locations, followed by genetic drift, especially for the population of Campos dos Goytacazes. The flow cytometry analysis showed that the nuclear DNA content is $2C = 1.16$ picograms in all populations analyzed, except on PLC population, in which was measured twice of DNA content ($2C = 2.32$ picograms). This result was explained by cytogenetic analysis which revealed individuals with $2n = 50$ chromosomes in ES and individuals $2n = 100$ chromosomes in RJ. This result may be due for PLC's geographical isolation, environmental characteristics of different evolutionary processes.

Keywords: Atlantic Forest, Conservation Biology, Rocky Outcrops.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Capítulo 1. Novelties on <i>Pitcairnia azouryi</i> (Bromeliaceae): An endemic species of Atlantic Forest.....	17
Abstract.....	18
Resumo.....	19
Introduction.....	20
<i>Pitcairnia azouryi</i> on collections and in the field.....	21
Morphology, ecological aspects and conservation status of <i>P. azouryi</i>	25
References.....	29
Capítulo 2. Transferability of nine nuclear microsatellite primers to <i>Pitcairnia azouryi</i> (Bromeliaceae), an endemic species of Atlantic Forest inselbergs.....	31
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Material and Methods.....	34
Results and discussion.....	35
References.....	39
Capítulo 3. Abordagem molecular e citogenética em uma espécie de Bromeliaceae endêmica de inselbergs da Floresta Atlântica.....	42
Resumo.....	43

Introdução.....	45
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	54
Discussão.....	59
Referências.....	68
Conclusão Geral.....	79

Índice de Figuras

Capítulo 1. Novelties on *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae): An endemic specie of atlantic forest.

Figure 1. Geographical distribution of the seven localities occurrence of *P. azouryi*.....23

Figure 2. . Localites were *P. azouryi* was found: A. Pedra Lisa-Burarama, B. Pedra do Jacú, C. Pedra das Andorinhas, D. Pedra Três Irmãs, E. Pedra Parada Cristal, F. Pedra do Baú, G. Pedra Lisa Campos.....24

Figure 3. . *Pitcairnia azouryi*. A. Habit and vegetative aspect, B. inflorescence and flower detail.....25

Capítulo 2.Transferability of nine nuclear microsatellite primers to *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), an endemic species of Atlantic Forest inselbergs.

Figure 1. *Pitcairnia azouryi* in natural habitat. A-habit and vegetative aspect; B- flower detail.....33

Capítulo 3. Abordagem molecular e citogenética em uma espécie de Bromeliaceae endêmica de inselbergs da Floresta Atlântica.

Figura 1. *Pitcairnia azouryi* . A- hábito e aspecto vegetativo com formação de touceiras; B- Detalhe da flor e inflorescência.....47

Figura 2. Mapa com a distribuição dos pontos de coleta.....48

Figura 3. Gráfico do método de agrupamento demonstrando o melhor ΔK57

Figura 4. Resultados da análise bayesiana de 66 indivíduos de cinco populações de *P. azouryi*, ocorrentes em inselbergues da Floresta Atlântica do sudeste do Brasil, baseado em nove loci microssatélites. Representação gráfica das diferentes misturas genéticas para $K= 3$. As populações estão separadas por barras verticais.57

Figura 5. Histogramas representativos do mensuramento do conteúdo de DNA de *P. azouryi*. a) Histograma apresentando os picos G0/G1 de *P. azouryi* PLB no canal 116 ($2C = 1,16$ pg) e de *S. lycopersium* no canal 200 (padrão, $2C = 2,00$ pg). b) Histograma apresentando os picos G0/G1 de *P. azouryi* PTI no canal 100 (controle, $2C = 1,16$ pg) e de *P. azouryi* PLC no canal 200 (padrão, $2C = 2,32$ pg).....58

Figura. 6. Metáfases de *P. azouryi* apresentando (**a**) $2n = 50$ (PPC) e (**b**) $2n = 100$ cromossomos (PLC). Os cariótipos são constituídos por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, relativamente pequenos.....59

Índice de Tabelas

Capítulo 2. Transferability of nine nuclear microsatellite primers to *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), an endemic species of Atlantic Forest inselbergs.

Table 1. Results of transferability of nine microsatellite loci for *Pitcairnia azouryi*. A = number of alleles, Ar = allelic richness, Ao = estimated frequency of null alleles, He = expected heterozygosity, Ho = observed heterozygosity, Fis = inbreeding coefficient, ns = no significant values, statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (* $P < 0.005$).....36

Capítulo 3. Abordagem molecular e citogenética em uma espécie de Bromeliaceae endêmica de inselbergs da Floresta Atlântica.

Tabela 1. Populações amostradas. ($m.s.m$), metros sobre o nível do mar; (N), número de indivíduo.....49

Tabela 2. Resultados dos parâmetros genéticos dos 9 marcadores microsatélites. A = número de alelos, P_a = Alelos privados, R_s = Riqueza alélica, H_o = Heterozigosidade observada, H_e = Heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg, F_{is} = Coeficiente de endogamia, F_{st} = Diferenciação genética dentro, G_{st} = análogo de F_{st} , G_{is} = Coeficiente de endogamia – Nei 1973.....55

Tabela 3. Resultados dos parâmetros genéticos dos nove marcadores microsatélites dentro de cada população. N = número de indivíduos, R_s = riqueza alélica, H_o = Heterozigosidade observada, H_e = Heterozigosidade esperada, F_{is} = índice de fixação.....56

Tabela 4. Amova das cinco populações de *P. azouryi*.....56

Tabela 5. Estrutura populacional e distribuição geográfica de espécies de Bromeliaceae estudadas usando marcadores microsatélites.....61

INTRODUÇÃO GERAL

A família Bromeliaceae reúne cerca de 3.248 espécies subordinadas a 58 gêneros (Luther, 2012). Com exceção de *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed que ocorre na costa oeste do Continente Africano, os representantes da família distribuem-se quase que exclusivamente no Neotrópico. (Smith & Downs 1974, Jaques-Felix 2000, Givnish *et al.* 2004). No Continente Americano a família apresenta como limite norte de ocorrência os estados de Virgínia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos, e como limite sul o norte da Argentina (Smith & Downs, 1974). Os representantes são encontrados praticamente em todos os ambientes, do nível do mar aos elevados altiplanos da cordilheira dos Andes, em florestas pluviais como a Floresta Atlântica, ou regiões áridas como a Caatinga. A costa leste do Brasil abarca os grupos associados aos ambientes florestais, enquanto o escudo das Guianas reúne os gêneros relacionados à vegetação aberta. Estas duas regiões são consideradas os dois centros de diversidade genérica da família (Forzza 2005).

Com base em informações de macro e microfósseis, Benzing (2000) relata a existência de representantes de Bromeliaceae a partir do período Terciário Médio. Provavelmente as primeiras espécies de Bromeliaceae ocorriam ao norte da América do Sul, no Escudo das Guianas há 100 milhões de anos atrás (M.a.). Nesta região são encontradas várias espécies que emergem como linhagens basais em filogenias atuais para a família (Benzing, 2000; Givnish *et al.*, 2004; Barfuss *et al.*, 2005; Givnish 2011). Estas linhagens começaram a divergir por volta de 19 M.a. e há cerca de 15,4 M.a. o grupo iniciou sua radiação pelas Américas (Givnish *et al.* 2011).

Os representantes de Bromeliaceae caracterizam-se morfológicamente como ervas de folhas rosuladas e caule de entrenós curtos, com variadas formas de vida, podendo ser epífitas, rupícolas ou terrestres. Exibem características peculiares de adaptação como Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM), redução da raiz, formação das folhas em forma de roseta e tricomas foliares que favorecem o seu estabelecimento em ambientes xéricos ou mesófilos (Smith & Downs 1974, Rauh 1990, Benzing 2000; Crayn *et al.*, 2004). Apresentam folhas alternas, polísticas ou dísticas que em geral formam roseta. A superfície foliar geralmente é recoberta por tricomas, que exercem papel ecológico e

fisiológico fundamental na família. As margens variam de inteira a serrilhada ou espinescente. A inflorescência é habitualmente racemosa, simples ou composta, terminal ou axilar. Pode apresentar um escapo longo, curto e até ausente, portando brácteas comumente coloridas e vistosas. As flores podem ser numerosas ou exíguas, laxas ou congestas, bissexuadas, ou mais raramente unissexuadas, actinomorfas a zigomorfas, trímeras, hipóginas a epíginas, geralmente subtendidas por uma bráctea vistosa (Cronquist 1981, Dahlgren *et al.* 1985, Wanderley & Martins 2007). Em alguns gêneros são encontradas espécies cujas folhas rosuladas apresentam bainhas foliares imbricadas que formam no interior da roseta um ambiente propício ao acúmulo de água pluvial. Este tanque biológico (i.e. fitotelma) funciona como micro-habitat para várias espécies de animais (Benzing 2000).

Além do papel ecológico, a família é caracterizada por apresentar espécies de importância econômica e industrial, sendo utilizadas há muito tempo pelos povos nativos das Américas e estão constantemente presentes em suas culturas, como o comestível abacaxi *Ananas comosus* (L.) Merrill. Atualmente mais de 90 espécies são utilizadas como matéria-prima na fabricação de fibras para a indústria automobilística e têxtil, como as espécies *Ananas lucidus* Miller e *Neoglaziovia variegata* (Arruda da Camara) Mez, e na produção de fármacos como a espécie *Bromelia antiacantha* Bertoloni, (Bennet *et al.* 2001). No paisagismo, destacam-se espécies dos gêneros *Aechmea*, *Alcantarea*, *Billbergia*, *Gusmania*, *Pitcairnia*, *Quesnelia*, *Vriesea*, *Tillandsia*, dentre outros. O interesse no potencial ornamental e pelo cultivo de espécies da família é recente, ocorrendo no início da década de 90. A partir daí, a crescente demanda do mercado tem sido responsável pelo aumento do cultivo e comercialização de espécies com características ornamentais de interesse econômico, assim como pelo extrativismo ilegal.

Em relação à filogenia, Bromeliaceae emerge em uma posição basal dentro da ordem Poales, como grupo irmão de Typhaceae (Chase *et al.* 2000; Bremer, 2002; Givnish *et al.* 2007; APG III 2009). Com base em características morfológicas, como tipo de frutos, sementes, margem das folhas e posição do ovário, Smith & Downs (1974) reconheceram três subfamílias subordinadas em Bromeliaceae: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae. Bromelioideae foi caracterizada por apresentar folhas com espinhos, ovário ínfero, fruto baga e sementes lisas; Pitcairnioideae foi caracterizada pelas folhas com ou sem espinhos, ovário súpero ou ínfero, fruto cápsula e sementes com

apêndices não plumosos; Tillandsioideae foi caracterizada por apresentar folhas lisas, ovário súpero, fruto cápsula e semente com apêndice plumoso. Apesar de estas subfamílias serem aparentemente bem delimitadas com bases nesses caracteres, estudos filogenéticos não deram suporte a esta classificação. Nas reconstruções filogenéticas de Stevenson e Loconte (1995), Terry et al. (1997), Chase et al. (2000), Givnish et al. (2004) e Horres et al. (2000), a subfamília Pitcairnioideae emergia como parafilética (i.e., seus integrantes não descendem do mesmo ancestral direto comum). Givnish et al. (2007) propôs a divisão desta subfamília em seis subfamílias monofiléticas: Pitcairnioideae s.s. (i.e., com número reduzido de integrantes), Navioideae, Brocchinioideae, Lindmanioideae, Hechtioideae, Puyoideae. As subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae não sofreram alterações em suas circunscrições, dado que emergiram como monofiléticas.

A Floresta Atlântica é considerada um dos *hotspots* para a conservação devido ao seu alto grau de endemismo e diversidade de espécies (Myers et al. 2000; Mittermeier et al. 2004), considerado um dos centros de diversidade da família no Brasil. Neste bioma, a família Bromeliaceae está representada por 44 gêneros e 1.306 espécies (Forzza et al. 2014), sendo 85% destas espécies endêmicas do país. Mais da metade das espécies de Bromeliaceae da Floresta Atlântica ocorrem na região sudeste e sul da Bahia (Martinelli et al., 2008), região que apresenta alta riqueza de espécies e altos níveis de endemismo. Por esta razão, esta região é considerada uma área modelo para estudos relacionados a processos de especiação, além de disponibilizar um excelente sistema para estudos de hipóteses sobre evolução do isolamento reprodutivo (Van der Niet et al. 2006; Wendt et al. 2008).

Espécies de Bromeliaceae com distribuição restrita comumente são encontradas em inselbergues, (Forzza et al. 2014) que são afloramentos rochosos considerados “ilhas terrestres” por apresentar altos graus de isolamento (Porembski e Barthlott 2000). Inselbergues são frequentemente encontrados na região sudeste do Brasil e comportam floras muito distintas das observadas na vegetação de seu entorno (Porembski et al., 1998). Frequentemente estes afloramentos rochosos pertencem à propriedades particulares, fora de Unidades de Conservação, estando vulneráveis a diversas ações, como extrativismo ilegal para fins comerciais, queimadas, exploração de rochas ornamentais, etc. (Martinelli 2007, Coffani-Nunes 2002). A invasão por espécies

exóticas é outro fator que pode ser impactante à vegetação destes inselbergs (Porembski et al. 1998; Benzing. 2000; Versieux et al. 2010a.; Marques et al. 2012). Passando por esses processos antrópicos, os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo apresentam diversos inselbergues com alto índice de endemismo sendo considerados áreas prioritárias para conservação (Martinelli 2007).

O Espírito Santo se destaca como o segundo maior estado da federação em riqueza de espécies e endemismos para Bromeliaceae (Martinelli et al. 2008). A diversidade da família no estado pode ser ainda maior, principalmente na região sul, para a qual novas espécies foram recentemente descobertas (Martinelli & Forzza 2006; Versieux & Wanderley 2007; Leme et al. 2009), sempre associadas a afloramentos rochosos. Além disso, Martinelli (2007) relata a carência de informações biológicas nesses locais, discutindo as inúmeras particularidades encontradas em afloramentos rochosos. Este autor indica, ainda, a região montanhosa entre os municípios de Mimoso do Sul, Cachoeiro de Itapemirim e Alegre, como prioritárias para a conservação. Simonelli *et al.* (2007) destacam que a perda de habitats naturais devido à fragmentação da Floresta Atlântica está dentre as principais causas do decréscimo das populações de Bromeliaceae no estado do Espírito Santo. Além disso, atualmente a extração de rochas ornamentais nos inselbergues da Floresta Atlântica tem atingido a vegetação rupestre, outrora imune à expansão agrícola (Assis et al. 2007). Este panorama revela a necessidade urgente de investimento em estudos relacionados ao estado de conservação destas espécies. O conhecimento de como a variação genética de determinada espécie está distribuída em suas populações, é essencial para o estabelecimento de estratégias de conservação (Barbará et al 2007b). Nos últimos anos, alguns poucos trabalhos abordando a diversidade e estrutura genética de espécies de Bromeliaceae (Barbará et al. 2007a, Barbará 2009, Palma-Silva et al. 2009, Boisselier-Dubayle et al. 2010, Palma-Silva et al. 2011, Zanella et al., 2011, Lavor et al. 2014, Hmeljevski et al. 2014, Hmeljevski et al. 2015) foram realizados principalmente na região sudeste do Brasil, incluindo o Espírito Santo. Apesar disso, estudos desta natureza ainda são considerados ínfimos (Zanella et al. 2012), considerando que apenas cerca de 20 táxons dos mais de 3.000 existentes para a família em todo mundo foram estudados.

Estudos de diversidade e estrutura genética com espécies de Bromeliaceae em inselbergues na Floresta Atlântica (Barbará et al. 2007a, Barbará 2009, Palma-Silva et al.

2009, Palma-Silva et al. 2011) são escassos frente à riqueza de espécies desta família existente nestes ambientes. Como geralmente apresentam áreas de difícil acesso, realizar coletas nestes locais geralmente demanda a necessidade de profissionais qualificados em técnicas de escalada e equipamentos especiais, geralmente de custo elevado. Isto se reflete no conhecimento sobre a riqueza da flora destes locais, incluindo espécies de Bromeliaceae. De acordo com o conhecimento atual, espécies de Bromeliaceae endêmicas de inselbergues apresentam distribuição geográfica conhecida por uma ou poucas localidades. Tal fato pode se dever à distribuição global das espécies, mas não se deve descartar o efeito de lacuna de coleta. É possível que espécies de inselbergues consideradas endêmicas de uma ou poucas localidades estejam, na realidade, com sua distribuição geográfica subestimada pela carência de coletas. Ampliar o esforço de coleta de representantes de Bromeliaceae em inselbergues e, conseqüentemente, ampliar a distribuição global de espécies é prioritário ao desenvolvimento de estudos de biologia reprodutiva e genética de populações, os quais, por sua vez, permitirão o melhor entendimento do status de conservação dessas espécies.

Nos últimos anos alguns trabalhos foram desenvolvidos utilizando marcadores moleculares microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) na Floresta Atlântica, principalmente em afloramentos rochosos (Barbará et al. 2007a; Barbará et al. 2007b; Palma-Silva et al. 2009; Boisselier-Dubayle et al. 2010; Palma-Silva et al. 2011; Zanella et al. 2011; Miranda et al. 2012; Lavor et al. 2014; Hmeljevsk 2014). Estes estudos abordam principalmente a diversidade e estrutura genética populacional fornecendo informações dos processos evolutivos como especiação e hibridização, que frequentemente são registrados em Bromeliaceae. Tais processos ocorrem pela divisão de populações em unidades evolutivas independentes, envolvendo a separação genética e a diferenciação fenotípica (Coyne & Orr 2004). Esses mecanismos evolutivos podem ser desencadeados por alterações geográficas, ecológicas, morfológicas ou comportamentais, tendo os mecanismos de seleção natural e deriva genética fortemente atuantes (Petit & Excoffier 2009). O interesse pelo desenvolvimento de estudos de diversidade genética em inselbergs é devido provavelmente a este tipo de região apresentar alta riqueza de espécies e altos níveis de endemismo para a família.

A abordagem citogenética é potencialmente útil ao esclarecimento de questões evolutivas em Bromeliaceae, dado os frequentes eventos de hibridização e

poliploidização registrados para a família (Marchant 1967; Brown & Gilmartin 1986; Gitai et al. 2005). A citometria de fluxo é um método rápido e preciso para análise de ploidia e tamanho do genoma em plantas (Dolezel et al. 2007). O conteúdo de DNA (valor 2C) indica o total de DNA do núcleo 2n não replicado (Greilhuber et al. 2005), sendo informativo para estudos sobre a sua taxonomia e evolução (Ebert e Till 1997; Ramírez-Morillo e Brown, 2001). Apesar de ser um método relativamente rápido para quantificação do genoma, apenas cerca de 58 das mais de 3.000 espécies de Bromeliaceae existentes possuem seu conteúdo de DNA estimados (Leitch et al. 2010). Já os estudos citogenéticos em Bromeliaceae abarcam cerca de 10% do total de espécies. Depois de várias interpretações contraditórias referentes ao número básico de cromossomos (Brown & Gilmartin de 1986, 1989; Bellintani Assis & Cotias-de-Oliveira 2005). O número básico aceito atualmente foi proposto por Marchant (1967) com 2n= 50. Outros trabalhos relataram uma variação no número de cromossomos com 2n= 34 (Marchant 1967; Ramírez-Morillo & Brown 2001, Ceita et al. 2008) e 2n= 100 (Bellintani et al. 2005, Cotias-de-Oliveira et al. 2004; Louzada et al. 2010, Gitai et al. 2014).

O gênero *Pitcairnia* e a espécie *Pitcairnia azouryi*

Com um nome proposto pelo botânico francês Charles Louis L'Héritier de Brutelle em 1789, e baseando-se em uma coleta de *Pitcairnia bromelifolia* L'Hér., proveniente da Jamaica, o nome *Pitcairnia* foi dado em homenagem ao botânico amador Dr. William Pitcairn, que na época cuidava do jardim botânico onde a planta apresentou suas primeiras flores durante a visita de L'Hérithier a Inglaterra. O gênero *Pitcairnia* reúne aproximadamente 402 espécies (The plant list 2014), sendo o maior e o mais amplo gênero da subfamília Pitcairnioideae. Seus representantes ocorrem no México, América Central, Antilhas e por quase toda a América do Sul, com a maior riqueza de espécies na região andina (Smith & Downs 1974, Luther 2010). São ervas terrestres, geralmente rupícolas, ou epífitas, acaulescentes a longo-caulescentes. As folhas são em sua maioria marcescentes ou decíduas com zona de abscisão acima da bainha; as bainhas geralmente apresentam formação de bulbos e ausência de formação de tanques para acúmulo de água; as lâminas podem ser lineares a lanceoladas, a parte abaxial pode ser glabra ou lepidota, com margens inteiras ou aculeadas. Geralmente apresenta escapo terminal e

ereto. As inflorescências podem ser em forma de espiga, racemos ou panículas. As flores são bissexuais, longo-pediceladas a sésseis; as sépalas são livres e convolutas; as pétalas são livres, geralmente vistosas, de variadas cores, longas; estames geralmente exsertos; ovário variando de súpero a semi-ífero; óvulos numerosos, apendiculados ou raramente sem apêndices (Smith & Downs 1974; Benzing 2000).

A distribuição geográfica das espécies de *Pitcairnia* geralmente está relacionada à ocorrência de solos areno-pedregosos ou afloramentos rochosos, sendo que seus representantes habitam quase que exclusivamente neste tipo de substrato. Grande parte de suas espécies ocorrem nos afloramentos rochosos e campos de altitude nos domínios da Floresta Atlântica no sudeste nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, nos campos rupestres do Cerrado e na bacia Amazônica (Martinelli & Forzza 2006; Forzza et al. 2014). São conhecidas cerca de 53 espécies de *Pitcairnia* para o Brasil (Forzza et al. 2014). A metade delas ocorre na Floresta Atlântica, sendo 11 espécies registradas no estado do Espírito Santo (Forzza et al. 2014). Algumas destas se distribuem de forma restrita à apenas alguns Inselbergues. *Pitcairnia abissycola* Leme & L.Kollmann, *P. barbatostigma* Leme & A.P. Fontana, *P. capixaba* Leme & Fraga e *P. glauca* Leme & A.P. Fontana são endêmicas do Espírito Santo, ocorrendo estritamente em inselbergues.

Pitcairnia azouryi Martinelli & Forzza foi descrita como endêmica do Espírito Santo, até que se descobriu uma população da espécie em um inselbergue ao norte do Estado do Rio de Janeiro. A espécie se diferencia das demais do gênero que ocorrem no Brasil por apresentar flores com pétalas reflexas após a fecundação, lâmina foliar decídua com persistência das bainhas aculeadas e formação de grandes bulbos na base. Esta espécie foi descrita no ano de 2006, a partir de indivíduos ocorrentes estritamente no inselbergue popularmente conhecido como “Pedra das Andorinhas”, localizado no Município de Cachoeiro de Itapemirim (Martinelli & Forzza 2006). Posteriormente, uma coleta foi realizada no inselbergue conhecido como “Pedra Lisa”, e outra no inselbergue “Pedra do Baú” ambos no município de Campos dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro. Nenhuma informação adicional foi reportada para a espécie. Uma das principais razões pela qual *P. azouryi* permaneceu pouco estudada desde sua descrição deve-se à dificuldade de acessar seus locais de ocorrência, que geralmente demandam a necessidade de profissionais treinados no uso de equipamentos específicos para escalada. Como a espécie era conhecida por apenas três localidades, seu status de conservação

segundo os critérios da IUCN (2014) não pôde ser avaliado. A aplicação destes critérios considera aspectos relacionados à distribuição geográfica, quantidade de indivíduos em fase adulta e reprodutiva e ocorrência em unidades de conservação. Apesar de informações sobre a estrutura genética das espécies não serem diretamente utilizadas para aplicação dos critérios de conservação da IUCN (2014), o declínio na variação genética limita o potencial evolutivo, aumentando o risco de extinção (Zucchi 2002). O conhecimento de aspectos relacionados à distribuição geográfica e variação genética entre e dentro das populações de *P. azouryi* auxiliará no desenvolvimento de estratégias de conservação *in situ* e manejo desta espécie.

Os objetivos deste trabalho foram investigar e ampliar a distribuição geográfica de *P. azouryi* em inselbergues do sudeste do Brasil, avaliar a eficiência da transferibilidade de marcadores moleculares microssatélites originalmente desenvolvidos para *P. albiflos* Herb e *P. geyskessi* L. B. Sm., e através destes dados, analisar a diversidade e estrutura genética populacional da espécie. Além disso, objetivou-se determinar o conteúdo de DNA nuclear, e o número de cromossomos ao longo de sua distribuição global. Com esses dados avaliar o *status* de conservação de *P. azouryi* e auxiliar nas medidas e definições de conservação da espécie.

Referências

- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders & families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.
- Assis, A.M.; Magnago, L.F.S. & Fernandes, H.Q.B. (2007). Floresta Estacional Semidecidual de Terras Baixas, Submontana e Montana. In Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado Espírito Santo (C.N. Fraga & M. Simonelli, eds). *IPEMA*, Vitória, p. 51-54.
- Barbará , T; MARTINELLI, G; Fay, M. F; MAYO, S.J; and LEXER, C . (2007b) .Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16 : 1981 – 1992 .
- 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 glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Ann. Bot.* 103, 65–77.
- Barfuss, M.H.J.; Samuel, R.; Till, W. & Stuessy, T.F. (2005). Phylogenetic Relationships In Subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) Based On DNA Sequence Data From Seven Plastid Regions. *American Journal of Botany* 92:337–351.
- Benzing, D.H. (2000). Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge. *University Press*.
- Boisselier-Dubayle M.C, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C. (2010). Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on

- inselbergs in French Guiana a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography* 33: 175_184.
- Bremer K. (2002). Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). *Evolution*, 56:1374–1387.
- Brown G.K, Gilmartin A.J. (1989). Chromosome numbers in Bromeliaceae. *American Journal of Botany* 76: 657–665.
- Chase, M.W.; Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Rudall, P.J.; Fay, M.F.; Hahn, W.H.; Sullivan, S.; Joseph, J.; Molvray, M.; Kores, P.J.; Givnish, T.J.; Systma, K.J. & Pires, J.C. (2000). Higher-level Systematics of the Monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *In: Wilson, K.L. & Morrison, D.A. (eds.). Monocots: Systematics and evolution.* CSIRO. Melbourne, Australia. Pp. 3–16.
- Coffani-Nunes, J. V. (2002). Bromélias. *In: SIMÕES, L. L. & LINO, C.F. (eds.) Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais.* São Paulo: SENAC, pp. 119-132.
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. (2004). Speciation. Sunderland, MA: *Sinauer Associates.*
- Crayn, D.M., Winter, K. & Smith, A.C. (2004). Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habitat in the Neotropical family Bromeliaceae. *Plant Biology* 102: 3703-3708.
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. 2 ed. *New York Botanical Gardens, New York, 1262 p.*
- Dahlgren, R., Clifford, T.H. & Yeo PE. (1985). The families of the monocotyledons: Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag. Berlin.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *NatureProtocols* 2: 2233–2244.

- 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.Á, Martinelli, G, Monteiro, R.F, Santos-Silva, F, Saraiva, D.P, Paixão-Souza, B, Louzada, R.B, Versieux, L. (2014) *Bromeliaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6309>>. Acesso em: 31 Out. 2014
- Gitar' J, Horres R, Benko-Iseppon A.M. (2005). Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Syst Evol* 253:65–80. doi:10.1007/s00606-005-0306-8
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Evans, T.M., Hall, J.C., Pires, J.C., Berry, P.E. & Sytsma KJ.(2004). Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Science* 165: S35-S54.
- Givnish, T.J, Millan, K.C, Berry, P.E, Sytsma, K.J. (2007). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23:3–26
- Givnish, T.J, Barfuss, M.H.J, Benjamin, E.E.V, Riina R, Schulte K, Horres, R, Gonsiska, P.A, Jabaily R.S, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98:872–895.doi:10.3732/ajb1000059

- Greilhuber J, Doležel J, Lysák MA, Bennett MD. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95: 255–260.
- Grant, J.R. & Zijlstra, G. (1998). An annotated catalogue of the Generic names of the Bromeliaceae. *Selbyana* 19: 91-121.
- Hmeljevski KV, Freitas L, Domingues R, Pereira AR, Cancio AS, Andrade ACS, Machado MA, Viccini LF, Forzza RC. (2014). Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. *Flora* 209: 250-259
- Hmeljevski KV, Reis MSd, Forzza RC (2015) Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. *Journal of Heredity* 106(1): 93-101. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esu067>
- Horres, R. et al. (2000) Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from trnL (UAA) intron sequences of chloroplast genome. *Plant Biol* n.2, p. 306–315.
- Iucn (2014) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 20 September 2014.
- Jaques-Felix, H. (2000). The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana* 21:118-124.
- Lavor P, Van Den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM. (2014). Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the iron quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101 (7): 1 – 9.
- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF.(2010). Genome size dynamics and evolution in monocots. *J Bot.* doi: 10.1155/2010/862516

- Leme, E.M.C., Kollmann, L.J.C. & Fontana, A.P.(2009). Two new species from Pedra dos Pontões, an unexplored mountain in Espírito Santo, Brazil. *J. Bromeliad Soc. N.* 59(4), p. 145-192.
- Litt, M.; Luty, J. A. A. (1989). Hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetics*, v. 44; p. 397-401.
- Luther, H.E. (2010). An alphabetical list of bromeliad binomials. *The Bromeliad Society International*. Sarasota: p. 49.
- Luther HE. (2012). *An alphabetic list of bromeliad binomials*, 13th edn. Sarasota, FL: Marie Selby Botanical Gardens & Bromeliad Society International.
- Marchant C.J. (1967). Chromosome evolution in the Bromeliaceae. *Kew Bull* 21:161–168
- Marques , A. R. , J. P. Lemos Filho , and R. C. Mota . (2012) .Diversity and conservation status of bromeliads from Serra da Piedade, Minas Gerais, Brazil. *Rodriguésia* 63 : 243 – 255 .
- Martinelli, G. & Forzza, RC. (2006). *Pitcairnia* L'Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L.B. Sm. *Revista Brasil. Bot*, V.29, n.4, p. 603-607.
- Martinelli, G. (2007). Mountain biodiversity in Brazil. *Rev. bras. bot.* n. 30(4), p. 587-597.
- Martinelli, G. et all. (2008). Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59(1): p. 209-258.
- Miranda, FD, Gontijo, ABPL, Santiliano, FC, Favoreto, FC & Soares, TCB. (2012). Transferability and Characterization of Microsatellite Markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae. *Biota Neotrop.*12(3).

- Mittermeier , R. A. , P. R. Gil , M. Hoffman , J. Pilgrim , T. Brooks , C. G. Mittermeier , J. Lamoreux , and G. A. B. Fonseca. (2004) . Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX & Agrupación Sierra Madre, Mexico City, Mexico.
- Myers, N, Mittermeier, RA, Mittermeier, CG, Fonseca, GAB; Kent, J. (2000).Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p.853-858.
- Palma-Silva, C. , C. Lexer , G. M. Paggi , T. Barbará , F. Bered , and M.H. Bodanese-Zanettini. (2009). Range-wide patterns of nuclear andchloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropicalforest species. *Heredity* 103 : 503 – 512 .
- Palma-Silva , C. , T. Wendt , F. Pinheiro , T. Barbará , M. F. Fay , S. Cozzolino , and C. Lexer. (2011) . Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *MolecularEcology* 20 : 3185 – 3201 .
- Petit, R. J. & Excoffier, L. (2009).Gene flow and species delimitation.*Trends in Ecology and Evolution* 24 (7): 386-393.
- Porembski, S., Martinelli, G., Ohlemüller, R., Barthlott, W., (1998). Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Divers. Distr.* 4, 107–119.
- Porembski S, Barthlott W, eds. (2000). Inselbergs: biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions. (Ecological studies Vol. 146). Berlin; Heidelberg; New York: *Springer-Verlag*.
- Rauh, W. (1990).The bromeliad lexicon. 2 ed. *Blandford*, London.

- Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M., (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. v. 5, pp. 39-161.
- Simonelli, M., Fraga, C.N. & Fernandes, H.Q.B. (2007). Situação atual da flora ameaçada no Estado do Espírito Santo. In Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado Espírito Santo (C.N. Fraga & M. Simonelli eds), *IPEMA*. Vitória, p. 73-80.
- Smith, L.B. & Downs, R.J. (1974).Flora Neotropica, Monograph No.14, Part 1, Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Hafner Press*, New York. p.1-658.
- Stevenson, D. W. & Loconte, H. (1995).Cladistic analysis of monocot families. In: Rudall, P.J. et all. *Monocotyledons: Systematics and evolution*. Kew : Royal Botanical Gardens .
- Terry, R. G. , G. K. Brown , and R. G. Olmstead . (1997) . Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF* . *American Journal of Botany* 84 : 664 – 670.
- The Plant List. 2014. Version 1. Published on the Internet. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/>> Acesso em: Dezembro de 2014.
- Van Der Niet T, Johnson SD, Linder HP. (2006). Macroevolutionary data suggest a role for reinforcement in pollination system shifts. *Evolution* 60: 1596–1601.
- Versieux, L. & Wanderley, M.G.L. (2007).A new species of *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, Bromeliaceae. *Hoehnea* n. 34(3): p. 409-413.

- Versieux , L. M. , P. M. Elbl , M. G. L. Wanderley , and N. L. D. Meneze . (2010a)
. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. *Nordic Journal of Botany* 28 : 385 – 397 .
- Wanderley, M.G.L. & Martins S.E. coords.(2007). Bromeliaceae. *In*: Wanderley, M.G.L.,
- Wendt T, Coser TS, Matallana G e Guilherme FAG. (2008). An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 275: 31-41.
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F. (2011). Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 98:1511–1519.
- Zanella , C. M. , A. Janke , C. Palma-Silva , E. Kaltchuk-Santos, F. G. Pinheiro , G. M. Paggi , L. E. S. Soares , et al . (2012) Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* 35 : 1020 – 1026 .
- Zucchi, M.I. (2002) Análise da estrutura genética *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 148f.

Capítulo 1

NOVELTIES ON *Pitcairnia azouryi* (BROMELIACEAE): AN ENDEMIC SPECIES OF ATLANTIC FOREST

New findings on the distribution of *Pitcairnia azouryi* (Bromeliaceae), a species restricted to Atlantic Forest inselbergs

^{1,2,4}Vitor da Cunha Manhães; ²Dayvid Rodrigues Couto; ³Tatiana Tavares Carrijo; ³Fábio Demolinari de Miranda.

1 *Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brazil. <http://geneticaemmelhoramento.ufes.br/pos-graduacao/PGGM>*

2 *Departamento de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro*

3 *Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Alto Universitário, s/n, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brazil. <http://www.cca.ufes.br>*

4 *Corresponding author: Vitor da Cunha Manhães, e-mail: manhaesvc@gmail.com*

Abstract

New populations of *Pitcairnia azouryi* were discovered after extensive field work during a period of three years on 21 inselbergs in the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro, Brazil. This bromeliad is restricted to rocky outcrops (inselbergs) on the east coast of the Atlantic Forest. Since the species was first described, populations of *P. azouryi* were reported from three locations in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo. Although our discovery of new populations on the inselbergs Pedra Lisa, Pedra do Jacú, Pedra Três Irmãos and Pedra Parada Cristal, all located in the State of Espírito Santo, increased the number of locations to seven, it must still be considered a rare species. The analysis of new samples permitted the assessment of morphological variation within the species in relation to its characterization in the protologue. We classify *Pitcairnia azouryi* as endangered, taking into account the occurrence area of populations, the number of known populations and the fact that none of its occurrence areas is included in a conservation area.

Key-words: granitic rocky outcrops, conservation status, endemism, morphology.

Resumo

Exaustivo trabalho de campo realizado durante três anos em 21 inselbergues dos Estados do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, Brasil, possibilitaram a descoberta de novas populações de *Pitcairnia azouryi*. Esta espécie de Bromeliaceae é restrita aos afloramentos rochosos (inselbergues) da Floresta Atlântica. Desde sua descrição, *P. azouryi* era conhecida por populações localizadas em três localidades entre os Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. As novas populações descobertas nos inselbergues Pedra Lisa, Pedra do Jacú, Pedra Três Irmãs e Pedra Parada Cristal, todos localizados no Estado do Espírito Santo, aumentaram para sete os locais de ocorrência de *P. azouryi*, e revelam a raridade da espécie. A análise dos novos exemplares possibilitou avaliar os limites de variação morfológica de folhas e inflorescências em relação àqueles apresentados na descrição do protólogo da espécie. A análise dos novos exemplares possibilitou a avaliação da variação morfológica da espécie em relação à caracterização apresentada no protólogo da espécie. *Pitcairnia azouryi* é considerada ameaçada, dada a área de ocupação de suas populações, o número de populações conhecidas e o fato de que nenhuma de suas áreas de ocorrência está incluída em unidade de conservação.

Palavras-chave: afloramentos rochosos graníticos, *status* de conservação, endemismo, morfologia.

Introduction

Pitcairnia azouryi Martinelli & Forzza (Bromeliaceae) was described in 2006, and distinguished from the other 53 species of *Pitcairnia* (L'Hér. 1879) occurring in Brazil (Forzza et al. 2015) by the flowers with 10-18 cm long, with corolla reflex after fertilization, leaf blade deciduous by abscission zone with 4-6.5 cm long above the sheath, being aculeate only in marcescent portion (Martinelli & Forzza, 2006: 603,604). *P. azouryi* is one of the 15 species of *Pitcairnia* that occurs strictly in the east of Brazil (Martinelli & Forzza 2006: 603,604). These plants are generally grouped into patches along granitic rocky outcrops, also called “inselbergs”.

The holotype of *P. azouryi* is a specimen collected on the inselberg “Pedra das Andorinhas”, located in the Municipality of Cachoeiro de Itapemirim, in the state of Espírito Santo, Brazil. The species was considered endemic to the state of Espírito Santo until other populations were discovered on the inselbergs “Pedra Lisa” (Leme et al: 487) and “Pedra do Baú” (see Species Link), both located in the Municipality of Campos dos Goytacazes in the state of Rio de Janeiro. These were the only known populations of *P. azouryi*.

Probably because *P. azouryi* was described based on a single population, and later was discovered in only two other locations, its conservation status was not evaluated for the Brazilian list of threatened species of Bromeliaceae (Forzza et al. 2013). Apart from its geographical distribution, little is known about this species with respect to IUCN criteria (2014), such as the number of mature individuals capable of reproduction. The lack of information is to some extent related to the difficult access to the locations of occurrence, requiring the use of climbing equipment by trained professionals. It is unclear

whether the scarcity of herbarium collections of *P. azouryi* is due to the intrinsic rarity of the species or the difficulties in collecting it.

About 20% of the world flora is known by poor data (Giulietti et al. 2009: 25). Nevertheless, in order to develop conservation strategies it is essential to understand the patterns of a species' geographical distribution (Xu Hang 2008: 632). In this context, this paper describes the results of extensive field work conducted between 2011 and 2013 that aimed to discover new populations of *P. azouryi* on Atlantic Forest inselbergs. A detailed description of morphological variation observed in these populations, and ecological aspects of the sites of occurrence are presented and discussed. Finally, we provide the conservation status for *P. azouryi* according to IUCN criteria (2014).

***Pitcairnia azouryi* on collections and in the field**

Prior to field work, we consulted the Lista de Espécies da Flora do Brasil and Species Link (INCT - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos) websites (last accessed 25 Jan 2015) in order to confirm previously identified locations of occurrence, and the number of specimens included in herbaria. Specimens collected in one locality in the state of Espírito Santo and two localities in the state of Rio de Janeiro were found, confirming literature data (Martinelli & Forzza: 603,604; Leme et al: 487).

In the field, 21 inselbergs were visited in search for other populations of *P. azouryi*. Eighteen of these inselbergs were located in the state of Espírito Santo (Municipalities Alegre, Apiacá, Cachoeiro do Itapemirim, Castelo, Guaçui, Jerônimo Monteiro, Mimoso do Sul), and three in the state of Rio de Janeiro (Municipality of Campos dos Goytacazes). These inselbergs are granitic rocky outcrops, sparsely covered

with soil, and exposed to extreme environmental conditions (Porembski & Barthlott 2000: 20). The climate is Cwa (Köppen), with dry winters and rainy summers. The average temperature was 24°C in the last 30 years, with an annual average rainfall of 1.410 mm.

We discovered populations in four localities (distance from the type locality Pedra das Andorinhas in Espírito Santo given in parentheses): Pedra do Jacú (6 Km) and Pedra Lisa-Burarama (10 Km), both in the Municipality of Cachoeiro do Itapemirim, and Pedra Três Irmãs (1.8 km) and Pedra Parada Cristal (3 Km), both in the Municipality of Jerônimo Monteiro. This set of inselbergs has a highly vertical topography with elevations ranging from 50-700 m. The populations of *P. azouryi* were found in an elevation range of 50-600 m, both in humid and dry locations, usually on the north face. The total occupancy area in the state of Espírito Santo increased from about 2 km² (type locality) to about 41.5 km², although the boundaries of the geographical distribution remained the same (Figure 1). The geographical coordinates of the *P. azouryi* populations on the inselbergs (Figure: 2a-g) are as follows: 1. Pedra Lisa-Burarama (20°42'04" S; 41°18'34" W), 2. Pedra do Jacú (20°43'19" S; 41°20'20" W), 3. Pedra das Andorinhas (20°46'19" S; 41°21'12" W), 4. Pedra Três Irmãs (20°46'19" S; 41°21'12" W), 5. Pedra Parada Cristal (20°47'39" S; 41°22'20" W), 6. Pedra do Baú (21°20'32" S; 41°22'26" W) and 7. Pedra Lisa-Campos (21°20'36" S; 41°24' 09" W).

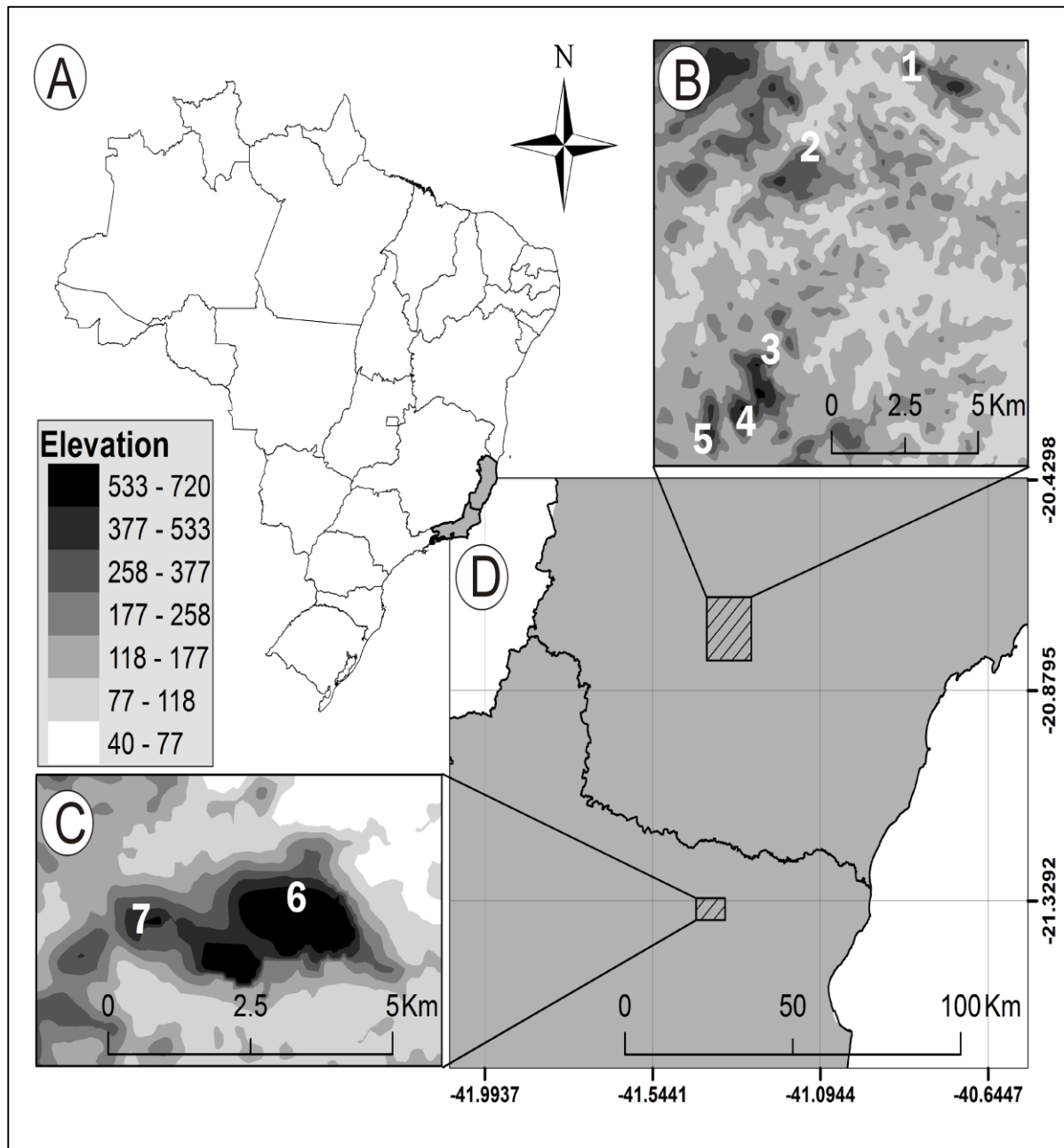


Figure 1. Geographical distribution of the seven localities occurrence of *P. azouryi*

In the state of Espírito Santo, the population on the inselberg Parada Cristal is noteworthy for the higher number of individuals occurring in larger patches, while Pedra do Jacú had the lowest number of plants. In the state of Rio de Janeiro, the population on Pedra Lisa was larger than that on Pedra do Baú. Vouchers of collected specimens were included in the herbaria MBML and VIES (Thiers: 2014).

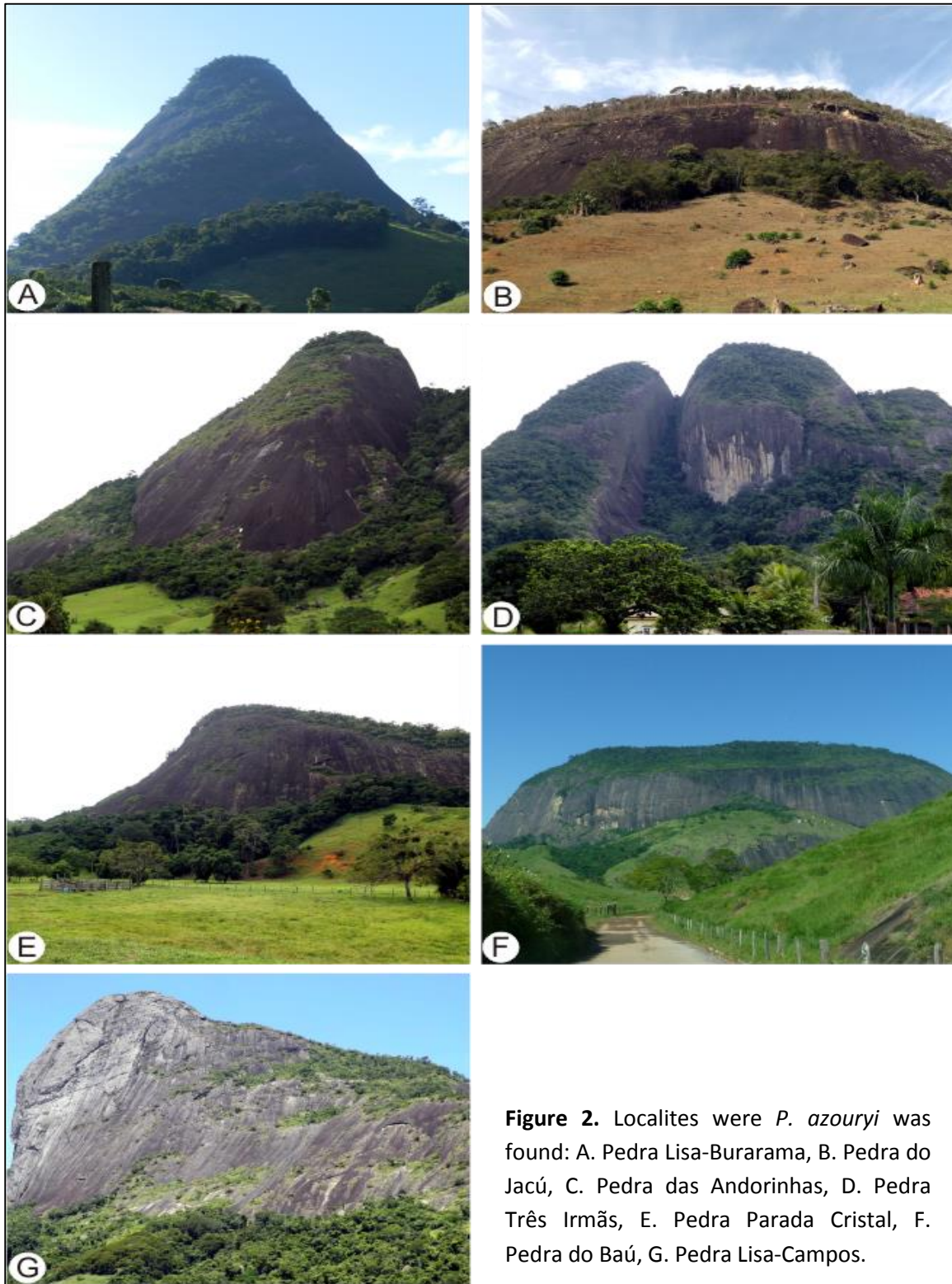


Figure 2. Localities where *P. azouryi* was found: A. Pedra Lisa-Burarama, B. Pedra do Jacú, C. Pedra das Andorinhas, D. Pedra Três Irmãs, E. Pedra Parada Cristal, F. Pedra do Baú, G. Pedra Lisa-Campos.

Morphology, ecological aspects and conservation status of *P. azouryi*

Pitcairnia azouryi Martinelli & Forzza, Brazilian Journal of Botany 29(4): 603-607, 2006. (Figure 3)

Type:— BRASIL. ESPÍRITO SANTO: Cachoeiro do Itapemirim, Fazenda Mangabeira, Pedra da Andorinha, rocky outcrop with *Alcantarea*, *Vellozia* and *Trilepsis*, 20°46'59"S e 41°20'94"W, elev. 130 m, 31-VIII-2004, fl., fr., G. Martinelli 15977 holotype RB, isotypes CEPEC, K, MBM, MO, NY, SP, SPF, US).

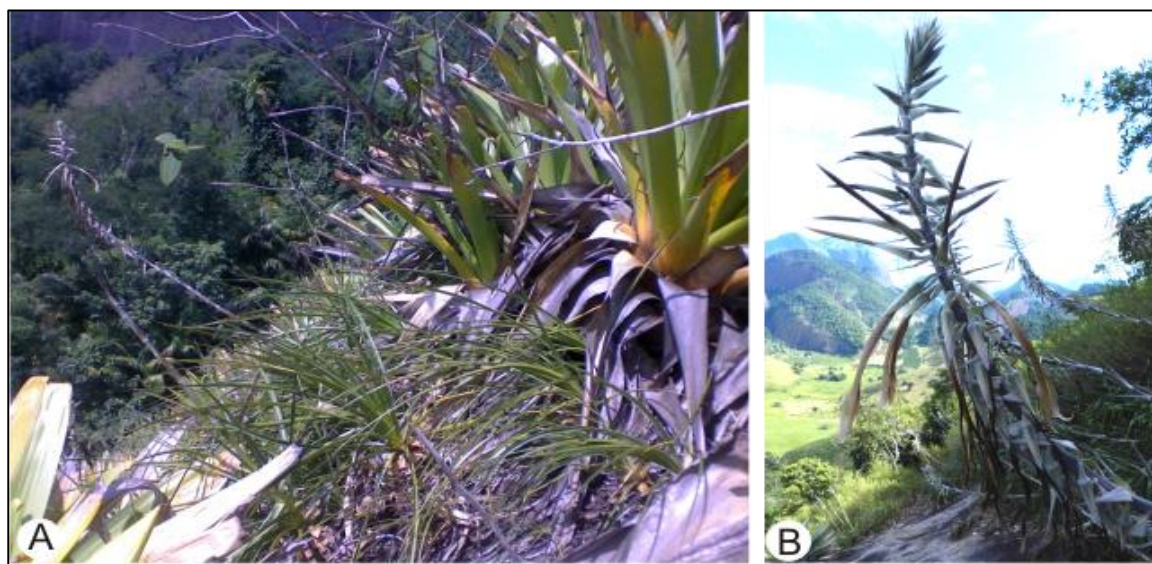


Figure 3. *Pitcairnia azouryi*. A. Habit and vegetative aspect, B. inflorescence and flower detail.

Herb rupicolous, heliophyllous, 132.2 to 160.7 cm tall. Leaves monomorphic, erect-arched or completely arched, marcescent external sheaths brown, chartaceous, pilose, margin entire, succulent, forming a bulb 9.3 -17.8 x 6.4 – 13.9 cm; foliar lamina 21 - 91.1 x 0,6 - 2.0 cm, deciduous, clear abscission zone 5-8 cm above the sheaths, green, lanceolate, apex long-attenuated, margin aculeate only in the marcescent part, lanose or not. Escape 112.1 to 148.3 cm long, green, lanuginous; bracts much longer than

the internodes, lanceolate, green, long-attenuated apex lanuginous. Inflorescences 14.9-88.2 cm long, simple, straight-arched, multiflorous; rachis lanuginosa; floral bracts 2.1-5.0 x 0.4-0.9 cm, shorter than the flowers, lanceolate to oval-lanceolate, lanose, green, apex attenuated. Flowers 9.1-13.4 cm long, zygomorphic, pedicellate; pedicel 0.9-2.3 cm long, lanose, green; sepals 2.8-4.3 x 0.3-0.8 cm, lanceolate, lanose, green with red stains, apex acute; sepals 2.8-4.3 x 0.3-0.8 cm, lanceolate, lanose, green with red stains, apex acute; petals 12-14.6 x 0.9-1.2 cm, lanceolate, glabrous, lower third cream at the onset of anthesis, cream-green upper third with stains vinaceous, nigrescents and spiral after fertilization, apex acute, symmetric; stamens partially exsert, yellow, fillets 9.8-11.6 cm length, anthers 0.7-2.4 cm long, linear, base slightly sagittal; ovary 0.9-1.4 cm length; $\frac{3}{4}$ inferior, stylus 10.6-12.8 cm long, stigma 0.4-0.5 cm long, conduplicate-spiral.

Selected material examined:— Cachoeiro de Itapemirim, Burarama, inselberg Pedra Lisa, 18 October 2013, Couto 2139 (VIES); 26 February 2013, Manhães 296 (VIES); 18 April 2013, Manhães 331 (VIES); inselberg Pedra das Andorinhas, 8 December 2012, Manhães 287 (VIES); Rio de Janeiro: Campos dos Goytacazes, Morro do Coco, inselberg Pedra-Lisa, 5 March 2013, Manhães 302 (VIES); 9 August 2013 Manhães 374 (VIES).

Commentaries:— The description presented here differs from the original description in some descriptive characters such as plant height (160 cm instead of 170 cm), leaf size (91 cm instead of 72 cm), and leaf length (112.1 mm instead of 148.3 mm). This difference is probably due to the number of populations evaluated here ($n = 4$).

Ecological aspects:— The species is restricted to the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro. The mature *P. azouryi* produces inflorescences of ca. 150 cm length. The flowers are zygomorphic, tubular and reflexed after anthesis, with cream-colored petals, and vinaceous maculae. Flowering was observed from December to April in Espírito Santo,

and in August in Rio de Janeiro. The fruits produce dehiscent capsules with small and round anemochoric seeds. Pollinators were not observed in any of the visited locations during the collecting expeditions. The co-occurrence of *P. azouryi* with other species of Bromeliaceae is uncommon, but it was found together with *Alcantarea* on almost all seven inselbergs. *Pitcairnia azouryi* populations were also observed with species of Araceae, Bignoniaceae, Cactaceae, Cyperaceae, Gesneriaceae, Malvaceae, Myrtaceae, and Velloziaceae.

Conservation status:— *Pitcairnia azouryi* is categorized as endangered (EN) B1 ab(iii) and B2 ab(iii). The species is endemic of Atlantic Forest inselbergs and its distribution is extremely restrict (EEO= 1.470 Km²). Besides that, the species' area of occupancy (AOO) is about 53.0 Km². The species occurs in seven locations, five of which are in the state of Espírito Santo and the other two in the state of Rio de Janeiro. Considering the distances between these populations (about 60 km) and the seed's morphology, one can expect that the species does not disperse from one area to another. In addition, none of the locations is protected by a conservation unit. In fact, all sites are located on private land. The populations are exposed to different types of anthropogenic disturbance, such as illegal collection for ornamental and commercial purposes, trampling and grazing by goats, and burnings (which during the dry season are intensified and constant in these regions). The vegetation of inselbergs on the east coast of Brazil was relatively protected from deforestation in comparison with lowland forests due to the difficult access to these sites. However, marble and granite extraction for the ornamental stone industry (Rocha & Souza 2010: 2) is another serious threat to the inselberg vegetation in the state of Espírito Santo, since this activity is very important for the local economy.

Acknowledgments

The authors thank the Federal University of Espírito Santo for granting the infrastructure to develop this study and to Dra. Rafaela Campostrini Forzza and Karlo Gregório for the suggestions that contributed to the improvement of this paper.

References

- Forzza, R.C., Costa, A., Siqueira Filho, Já., Martinelli, G., Monteiro, R.F., Santos-Silva, F., Saraiva, D.P., Paixão-Souza, B., Louzada, R.B., Versieux, L. (2015) *Bromeliaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available from: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6309> (accessed 25 January 2015).
- Forzza, R.C., Costa, A.F. da, Leme, E.M.C., Versieux, L. de M., Wanderley, M. das G.L., Louzada, R.B., Monteiro, R.F., Judice, D.M., Fernandez, E.P., Borges, R.A.X., Penedo, T.S. de A., Monteiro, N.P., Moraes, M.A. (2013) *Bromeliaceae*. In: G. Martinelli, G. & Moraes, M.A. (eds.). *Livro Vermelho da Flora do Brasil* Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 315-396.
- Herbário do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), Herbário do Museu Botânico Municipal (MBM), Herbário Mello Leitão (MBML-Herbario), Missouri Botanical Garden - Brazilian records (MOBOT_BR), The New York Botanical Garden - Brazilian records (NY), Herbário Dimitri Sucre Benjamin (RB), Banco de DNA do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RBDna), Herbário do Estado "Maria Eneyda P. Kaufmann Fidalgo" - Coleção de Fanerógamas (SP), Herbário da Universidade de São Paulo (SPF), Herbário Central da Universidade Federal do Espírito Santo VIES (VIES). *INCT - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos* (Available from: <http://inct.splink.org.br>) (accessed 25 January 2015).

- Giulietti, A.M.; Rapini, A.; Andrade, M.J.G.; Queiroz, L.P. & Silva, J.M.C. (2009) *Plantas raras do Brasil. Belo Horizonte, Conservação Internacional.*
- Iucn (2014) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. (accessed 25 January 2015).
- Leme, E.M.C., Fontana, A.P., Halbritter, H. (2010) Three New *Pitcairnia* Species (Bromeliaceae) from the Inselbergs of Espírito Santo, Brazil. *Systematic Botany*, 35(3): pp. 487–496. DOI: 10.1600 / 036364410792495971
- Martinelli, G. & Forzza, R.C. (2006) *Pitcairnia* L'Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P.azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L.B. Sm. *Revista Brasil. Bot*, V.29, n.4, p. 603-607. DOI: 10.1590 / S0100-84042006000400010
- Rocha, C.H.B & Sousa, J.G. (2010) Análise ambiental do processo de extração e beneficiamento de rochas ornamentais com vistas a uma produção mais limpa: aplicação Cachoeiro de Itapemirim – ES. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, 6(9): 1-17.
- Thiers, B. (2014) Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Gardens's Virtual Herbarium. Available from: <http://sweetgum.nybg.org/ih/> (accessed 25 January 2015).
- Xu, Haigen , Wu, Jun, Liu, Yan, Ding, Hui, Zhang, Ming, Wu, Yi, Wang, Lili (2008) Biodiversity Congruence and Conservation Strategies: A National Test. *BioScience* 58(7): 632-639. DOI: 10.1641/B580710

Capítulo 2

**Transferability of nine nuclear microsatellite primers to *Pitcairnia azouryi*
(Bromeliaceae), an endemic species of Atlantic Forest inselbergs**

**Transferability of nine nuclear microsatellite primers to *Pitcairnia azouryi*
(Bromeliaceae), an endemic species of Atlantic Forest inselbergs**

V.C. Manhães¹; F.D. Miranda²; T.T.Carrijo^{2,3}

1. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP: 29.500-000, Alegre – ES, Brazil.

2. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP: 29.500-000, Alegre – ES, Brazil.

3. Corresponding author: e-mail: tcarrijo@gmail.com

Tel.: +55 28 3552-8615, FAX: +55 28 3552-8627

Abstract *Pitcairnia azouryi* Martinelli and Forzza is a species of Bromeliaceae endemic of Atlantic Forest inselbergs, and known by few populations. Knowledge of the genetic structure of vegetable species enables the definition of handling and preservation plans. DNA molecular markers are useful tools to obtain this information, especially the microsatellites or SSR. However, these markers are not available for *P. azouryi*. Aiming at filling this knowledge gap for *P. azouryi*, 14 microsatellite nuclear primers (SSR) were tested in 27 individuals of this species, with the purpose of finding polymorphisms and assessing the possibility of transferability to this species of primers previously developed for other species of the *Pitcairnia* genus. Satisfactory amplifications and polymorphisms were found in nine loci. Expected and observed heterozygosity is similar to other population genetics studies with other species of Bromeliaceae. The results enable studies of population genetics of *P. azouryi* necessary to develop conservation actions for the species in the future.

Keywords cross-amplification, conservation biology, SSR markers

Introduction

Pitcairnia azouryi Martinelli & Forzza (figure1) is endemic a species of Atlantic Forest in Brazil, known for few populations restrict to inselbergs at the North of Rio de Janeiro State and South of Espírito Santo State. None of it inselbergs belongs to a protections units. Therefore, the populations of *P. azouryi* remains vulnerable to indiscriminate collection for ornamental purposes, stomping by goats, burning and loss of habitat due to exploitation of ornamental rocks. Studies of genetic structure of plant species may help to develop preservation strategies by providing information regarding the gene flow between populations, genetic divergence and reproductive success. Microsatellites or Simple Sequence Repeats (SSR) (Litt and Luty 1989) are useful tools to obtain such information. However, the development of specific SSR primers for a species may have a high cost, which makes it unfeasible to use such markers for various species. The assessment of transferability may be a low cost alternative. This technique consists in using primers originally developed for a species in PCR assays, using DNA samples from a different species. In this case, the evolutionary proximity between the two species allows for successful use of the pairs of starters (Barbará, 2007). Here we report the transferability of microsatellite markers originally developed for *Pitcairnia albiflos* Herb and *P. geyskesii* L. B. Sm. for *P. azouryi*, aiming at developing a tool for analysis of the diversity and genetic structure of this species.

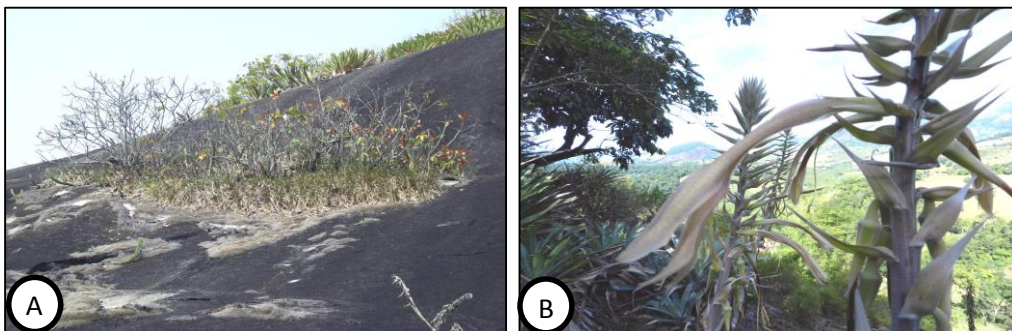


Figure 1. *Pitcairnia azouryi* in natural habitat. A- habit and vegetative aspect; B- flower detail.

Material and Methods

Plant material

Leaf samples from 27 individuals of *P. azouryi* (Figure 1) were collected at Cachoeiro de Itapemirim Municipality, Espírito Santo State (20°46'18.35"S e 41°21'1.04"W), and stored in silica gel for extraction and purification of DNA.

DNA extraction and amplification

The extraction and purification of DNA were made applying the CTAB method (Doyle and Doyle 1990). Fourteen microsatellite markers previously developed for *Pitcairnia albiflos* (Paggi, 2008): loci - PaA05, PaA09, PaA10, PaB11, PaB12, PaC05, PaD07, PaZ01 and *P. geyskesii* (Sarhou, 2003): loci - Pit2, Pit4, Pit5, Pit6, Pit9, Pit12, were tested and analyzed. In order to improve the PCR result, the optimal annealing temperatures of each pair of primers to be tested were initially determined. In all cases, microsatellite loci were amplified in a 15 µL final reaction volume containing 2 mM of MgCl₂, 10mM/50mM of Tris/KCl pH 8.3, 0.1mM of each nucleotide (dNTP), 0.4 µM of primer, 1 unit of Taq polymerase and 30 ng of genomic DNA. Amplifications were performed in thermal cycler (Applied Biosystems, Veriti), under the following conditions: 5 minutes at 94 °C, followed by 30 cycles composed of three steps: a) 1 minute at 94 °C, b) 1 minute at 55 °C and c) 1 minute at 72 °C, with a final step of 7 minutes at 72° C. Amplified fragments were separated by electrophoresis in acrylamide gel 8% on TBE buffer (Tris – 0.89 M, Boric acid – 0.89 M and EDTA – 0.02 M), at 100 Volts for approximately three hours. After the run, the gels were colored with ethidium bromide, and photographed under ultraviolet light and analyzed.

DATA analysis

In order to calculate the estimates of allele diversity and test for equilibrium Hardy-Weinberg (EHW) the software POPGENE 1.32 (Yeh, 1997) was used. The inbreeding coefficient (F_{is}) and allelic richness (A_r), were estimated by the software Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995). The software Microchecker 2.2.3 was used for detection and correction of null alleles (*Brookfield 1* estimator). The polymorphic information content (PIC) was calculated using the software GENES 2013.1.1 (Cruz, 2008).

Results and discussion

Nine out of the 14 primers tested in the present study (64.2%) showed satisfactory amplification products. All 9 loci were polymorphic, showing an average allele number of 4.4 (2-8). Results obtained here are different from other reported for *Pitcairnia albiflos* (Paggi, 2008) and *P. geyskesii* (Sarhou, 2003) regarding the number of detected alleles and the size of the fragments generated. A possible explanation for this difference is the use of different genotyping methodologies among studies, or the fact that the differences found result from the variations in the number of tandem repeat on the tested loci, Wang et al (2009). The average observed heterozygosity (H_o) was 0.461 and average expected heterozygosity (H_e) was 0.621. The average inbreeding coefficient was 0.208. HWE deviations were found in seven loci, where the levels of observed heterozygosity were lower than the expected (Table 1).

Table 1. Results of transferability of nine microsatellite loci for *Pitcairnia azouryi*. *A*= number of alleles, *Ar*= allelic richness, *Ao*= estimated frequency of null alleles, *He*= expected heterozygosity, *Ho*= observed heterozygosity, *Fis*= inbreeding coefficient, *ns*= no significant values, statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (**P* < 0.005).

Locus	Size range (bp)	A	Ar	Ao	He	Ho	Fis
PaA05	242-258	7	5.740	0.1294	0.7582	0.5185	0.320*
PaA09	190-214	7	5.938	0.1403	0.7594	0.5000	0.346*
PaA10	188-208	2	2.000	<i>ns</i>	0.4920	0.2963	0.402*
PaB12	241-303	8	8.000	0.2643	0.8564	0.3500	0.598*
PaC05	149-201	7	6.951	<i>ns</i>	0.7771	0.7200	0.075*
PaZ01	193-199	2	2.000	<i>ns</i>	0.4286	0.4400	-0.027
Pit6	174-188	2	2.000	<i>ns</i>	0.4827	0.7692	-0.613
Pit9	88-106	5	3.963	0.28	0.6237	0.1600	0.747*
Pit12	480-488	2	2.000	<i>ns</i>	0.4114	0.4000	0.028*

The observed and expected heterozygosity values find in the present study are similar to those reported in other studies for *Pitcairnia* species (e.g., Paggi et al. (2008) for *Pitcairnia albiflos* Herb. (Ho= 0.408 and He= 0.663); Boisselier-Dubayle (2010) for *P. geyskesii* L. B. (Ho= 0.293 and He= 0.325); Miranda et al. (2012) *Pitcairnia flammea* Lindley (Ho= 0,31 e He= 0,42); for *Aechmea* species (e.g. Miranda et al. (2012) for *Aechmea nudicaulis* (Linnaeus) Grisebach (Ho= 0,48 e He= 0,50), and *Aechmea ramosa* Martius ex Schultes f. (Ho= 0,47 e He= 0,48); for *Vriesea* species (e.g., Palma-Silva et al. (2009) for *Vriesea gigantea* (Ho = 0.424 and He = 0.714); Lavor et al. (2014) for *V. minarum* L.B.Sm. (Ho= 0,146 and He= 0,663), for *Alcantarea* species (e.g., Barbará et al. (2007a) for *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Ho = 0,362 and He = 0,615) and *A. geniculata* (Wawra) J. R. Grant (Ho = 0.357 and He = 0.429), and *Bromelia* species (e.g.,

Zanella et al. (2011) for *Bromelia antiacantha* Bertol. ($H_o = 0,369$ and $H_e = 0,746$). Deficit of heterozygote revealed by the observed heterozygosity lower than the expected heterozygosity, was predominant in these studies. Four loci showed null alleles (PaA05, PaA09, PaB12 e Pit9). The mean value of allelic richness for nine loci was 4.288. This value was higher than that reported by Lavoura et al. (2014) for *V. minarum* L.B.Sm. (2.678), (e.g., Palma-Silva et al. (2009)) for *Vriesea gigantea* (1.41), Boisselier-Dubayle (2010) for *P. geyskesii* L. B. (2.65).

Considering that the success rate in the transfer of markers among species of the same genus in monocots is around 40% (Barbará 2007b), the transferability level obtained for *P. azouryi* here is considered high, since nine (64%) of the 14 primers provide positive results. The transferability among species of the same subfamily of Bromeliaceae (see Palma-Silva et al 2006; Barbará et al 2007) is probably due to the great adaptive radiation of the family, leading to low levels of divergence in their DNA sequences. Three out of the six primers (50%) developed for *P. geyskesii* (Pit6, Pit9 and Pit12) presented amplification. Primers developed for *P. albiflos* were the ones that presented the best results for *P. azouryi*, six out of the eight (75%) loci tested (PaA05, PaA09, PaA10, PaB12, PaC05 and PaZ01) presented satisfactory amplification. The success in transferability of the primers of *P. albiflos* and *P. geyskesii* for *P. azouryi* may be explained by the evolutionary proximity of the species. The nine markers assessed were successfully transferred and should be used in subsequent studies for assessment of diversity and genetic structure in natural populations of *P. azouryi*.

Acknowledgments

To MSc. Dayvid Rodrigues Couto for the support in the collection of botanical material and Universidade Federal do Espírito Santo for the infrastructure provided.

References

- Barbara T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007a) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol Ecol* 16:1981–1992.
- Boisselier-Dubayle M.C, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C (2010) Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana: a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography* 33: 175–184.
- Cruz CD (2008). Programa Genes: diversidade genética. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate Fstatistics. *J Hered* 86:485–486.
- Iucn (2014) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 20 September 2014.
- Lavor P, Van Den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM (2014) Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the iron quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101 (7): 1 – 9.

- Litt, M, Luty, JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetics*, v. 44; p. 397-401.
- Miranda, FD, Gontijo, ABPL, Santiliano, FC, Favoreto, FC & Soares, TCB (2012). Transferability and Characterization of Microsatellite Markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and Bromelioideae. *Biota Neotrop.* 12(3).
- Paggi GM.; Palma-Silva C.; Bered F.; Cidade FW.; Sousa ACB.; Souza AP; Wendt T; Lexer C (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Resources*, v.8, p.980–982
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbara T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103:503–512
- Sarthou C.; Boisselier-Dubayle MC.; Lambourdiere J; Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes*, v.3, p. 221-223.
- Wang X, Rinehart TA, Wadl PA, Spiers JM, Hadziabdic D, Windham MT & Trigiano RN (2009). A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 2432-2436.

Yeh FC, Yang RC, Boyle BJ, Ye ZH and Mao JX (1997) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canadá.

Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 98:1511–1519.

Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis MS, Bered F (2012) Microsatellites in the Endangered Species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and Cross-Amplification in Other Bromeliads. *Int. J. Mol. Sci*, 13.

Capítulo 3

Abordagem molecular e citogenética em uma espécie de Bromeliaceae endêmica de inselbergues da Floresta Atlântica

Abordagem molecular e citogenética em uma espécie de Bromeliaceae endêmica de inselbergs da Floresta Atlântica

^{1,3}Vitor da Cunha Manhães; ²Fábio Demolinari de Miranda, ²Wellington Ronildo Clarindo, ²Tatiana Tavares Carrijo.

1 *Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brazil.* <http://geneticaemmelhoramento.ufes.br/pos-graduacao/PGGM>

2 *Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Alto Universitário, s/n, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brazil.* <http://www.cca.ufes.br>

3 *Corresponding author: Vitor da Cunha Manhães, e-mail: manhaesvc@gmail.com*

Resumo

- **Premissa que Estudo:** Este estudo aborda aspectos moleculares e citogenéticos de *Pitcairnia azouryi* Martinelli & Forzza, uma espécie endêmica de inselbergues da Floresta Atlântica através do estudo das suas populações a respeito de sua diversidade genética, a quantidade de DNA nuclear e o número de cromossomos.
- **Métodos:** Amostras de folhas de 13-15 indivíduos foram coletados em cinco populações entre o sul do ES e norte do RJ, num total de 66 indivíduos. Nove marcadores microssatélites foram utilizados em PCRs. As variantes genéticas foram identificados a partir de polimorfismo entre indivíduos amostrados, detectada por eletroforese em gel de acrilamida a 8%. Os parâmetros de diversidade e estrutura genética de populações foram calculados utilizando os softwares Genes, Fstat, PopGene e Structure. A análise de citometria de fluxo foi efetuada utilizando amostras de folhas obtidas a partir de cinco indivíduos adultos de cinco populações distintas. Análises citogenéticas foram realizadas com raízes obtidas a partir de sementes germinadas coletados em duas populações.

• **Principais Resultados:** Os nove *primers* SSR produziram produtos de amplificação satisfatórios, e polimórficos. O número de alelos por loco variou entre dois e oito. Os valores do índice de diversidade genética (G_d) e do índice de fixação (F_{is}) em populações variou entre 0,459-0,578 e 0,047-0,208, respectivamente. O valor observado para o F_{st} mostrou que 81,20 % da variação genética total é encontrada dentro das populações e a ocorrência de fluxo gênico (N_m) 1,073 (número médio de migrantes por geração). Análise Bayesiana indicou que um modelo de $k = 3$ populações é capaz de explicar melhor a variação nos dados sobre a estrutura genética. A análise de citometria de fluxo mostrou que o teor de DNA nuclear é $2C = 1,16$ picogramas em todas as populações analisadas, exceto na população PLC, no qual foi medida duas vezes o teor de DNA ($2C = 2,32$ picogramas). A análise citogenética revelou indivíduos com $2n = 50$ cromossomos no ES e indivíduos $2n = 100$ cromossomos no RJ.

• **Conclusão:** A alta variação do índice de fixação adicionado à grande variação genética dentro e entre as populações sugerem a ocorrência do efeito fundador na dispersão de novos indivíduos em novos locais, seguido de deriva genética, especialmente para a população de Campos dos Goytacazes. As características encontradas em relação ao conteúdo de DNA nuclear e do número cromossômico podem ser resultado tanto do isolamento geográfico de PLC quanto das características ambientais locais ou mesmo devido aos processos evolutivos.

Introdução

As regiões tropical e subtropical abrigam a maior parte da biodiversidade e endemismo de plantas do planeta (Myers et al., 2000). Dentre as Angiospermas que ocorrem nestas regiões, a família Bromeliaceae se destaca pela expressiva variedade de formas e ambientes ocupados por suas espécies. A família é composta por 58 gêneros e aproximadamente 3.352 espécies (Luther 2012), desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, sendo considerada uma das maiores e mais diversas das regiões Neotropicais (Givnish et al, 2011). Os representantes de Bromeliaceae podem ser plantas terrestres (saxícolas, rupícolas) ou epífitas, capazes de ocupar altitudes desde o nível do mar até a Cordilheira dos Andes e diferentes biomas. A recente diversificação aliada à capacidade de ocupar diferentes ambientes tornam suas espécies excelentes modelos para estudos ecológicos e evolutivos.

Tradicionalmente, a família Bromeliaceae compreendia as subfamílias Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Smith & Downs 1974, 1977, 1979). No entanto, uma nova classificação foi proposta para a família por Givnish et al. (2007), com base no uso de ferramentas moleculares. Basicamente, a subfamília Pitcairnioideae foi segregada em cinco novas subfamílias: Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae e Puyoideae, totalizando oito subfamílias. Apesar do desenvolvimento de filogenias robustas terem proporcionado a melhor compreensão sobre a sistemática de Bromeliaceae, o entendimento sobre a evolução de mecanismos de isolamento reprodutivo (ou especiação) tem sido alvo de grande interesse na família (e.g. Palma-Silva et al, 2011). Nesse sentido, espécies de Bromeliaceae endêmicas de afloramentos rochosos emergem como excelentes modelos para estudos ecológicos e evolutivos.

A Floresta Atlântica é considerada um dos *hotspots* para a conservação devido seu alto grau de endemismo e diversidade de espécies (Myers et al, 2000; Mittermeier et al., 2004). Neste ambiente a família Bromeliaceae é composta por 44 gêneros e 1.306 espécies (Forzza et al. 2014), sendo 85% destes táxons endêmicos do país. Uma ampla parte desses táxons restritos ocorre em inselbergues, que frequentemente são encontrados na região sudeste do Brasil e comportam floras muito distintas das observadas na vegetação de seu entorno. A maior fração desses inselbergues está inserida em propriedades particulares, fora de unidades de conservação e vulneráveis a diversos impactos antrópicos. Estes aspectos conduzem para a perda de habitat em consequência das atividades humanas como, coleta para fins ornamentais-comerciais, queimadas e exploração de rochas ornamentais. (Porembski et al, 1998; Benzing, 2000; Versieux et al., 2010a; Marques et al., 2012)

A análise das categorias de risco de espécies vegetais ameaçadas no Brasil revelou que Bromeliaceae apresenta o maior número de táxons considerados “Criticamente em perigo” (Martinelli e Moraes, 2013). Portanto, tornam-se necessários estudos de genética da conservação para estimar o risco de extinção das espécies e auxiliar em medidas mitigadoras e nos processos de criação de unidades de conservação. Estudos de diversidade e estrutura genética de espécies vegetais podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação por fornecer informações dos processos evolutivos como a especiação e a hibridização, que são frequentemente encontrados na família. Tais processos ocorrem pela divisão dentro de populações, em unidades evolutivas independentes, envolvendo a separação genética e diferenciação fenotípica (Coyne, & Orr 2004). Este processo pode ser desencadeado por alterações geográficas, ecológicas, morfológicas ou comportamentais, tendo os mecanismos de seleção natural e deriva genética fortemente atuantes (Petit, & Excoffier 2009).

Este estudo avaliou a diversidade genética de *Pitcairnia azouryi* Martinelli e Forzza, uma espécie endêmica de inselbergues do leste do Brasil, com base em marcadores microsatélites. Também foram avaliados o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo e o cariótipo, visando a melhor compreensão dos resultados obtidos no estudo de diversidade genética. Os resultados auxiliarão no entendimento dos efeitos do declínio de populações desta espécie, e norteando o desenvolvimento de estratégias de conservação *in situ* de *P. azouryi*.

Material e Métodos

Espécie em estudo e amostragem

Pitcairnia azouryi (Figura 1) é endêmica de inselbergues do leste da Floresta Atlântica. Atualmente a espécie é conhecida por sete localidades (Manhães et al, dados não publicados, Capítulo 1), cada uma isolada em um inselbergue entre o sul do Estado do Espírito Santo e o norte do Estado do Rio de Janeiro (Figura 2).

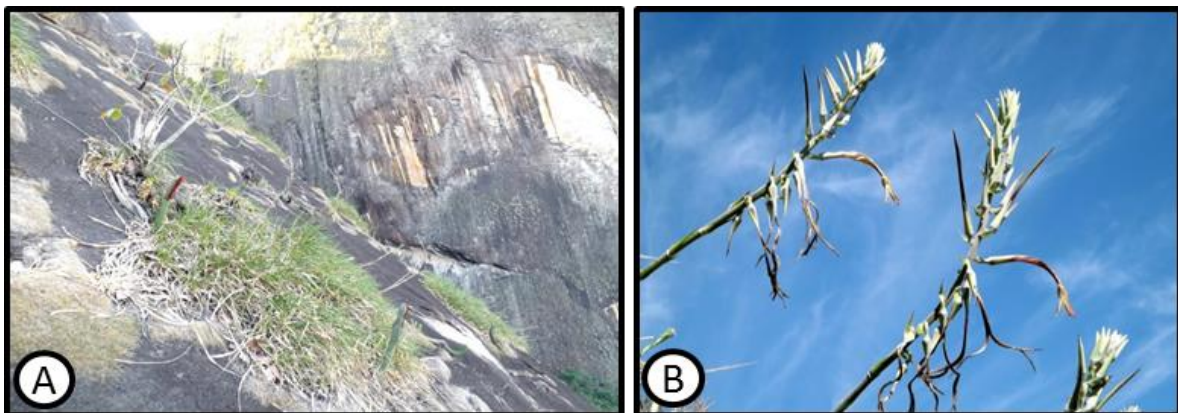


Figura 1. *Pitcairnia azouryi*. A- hábito e aspecto vegetativo com formação de touceiras; B- Detalhe da flor e inflorescência.

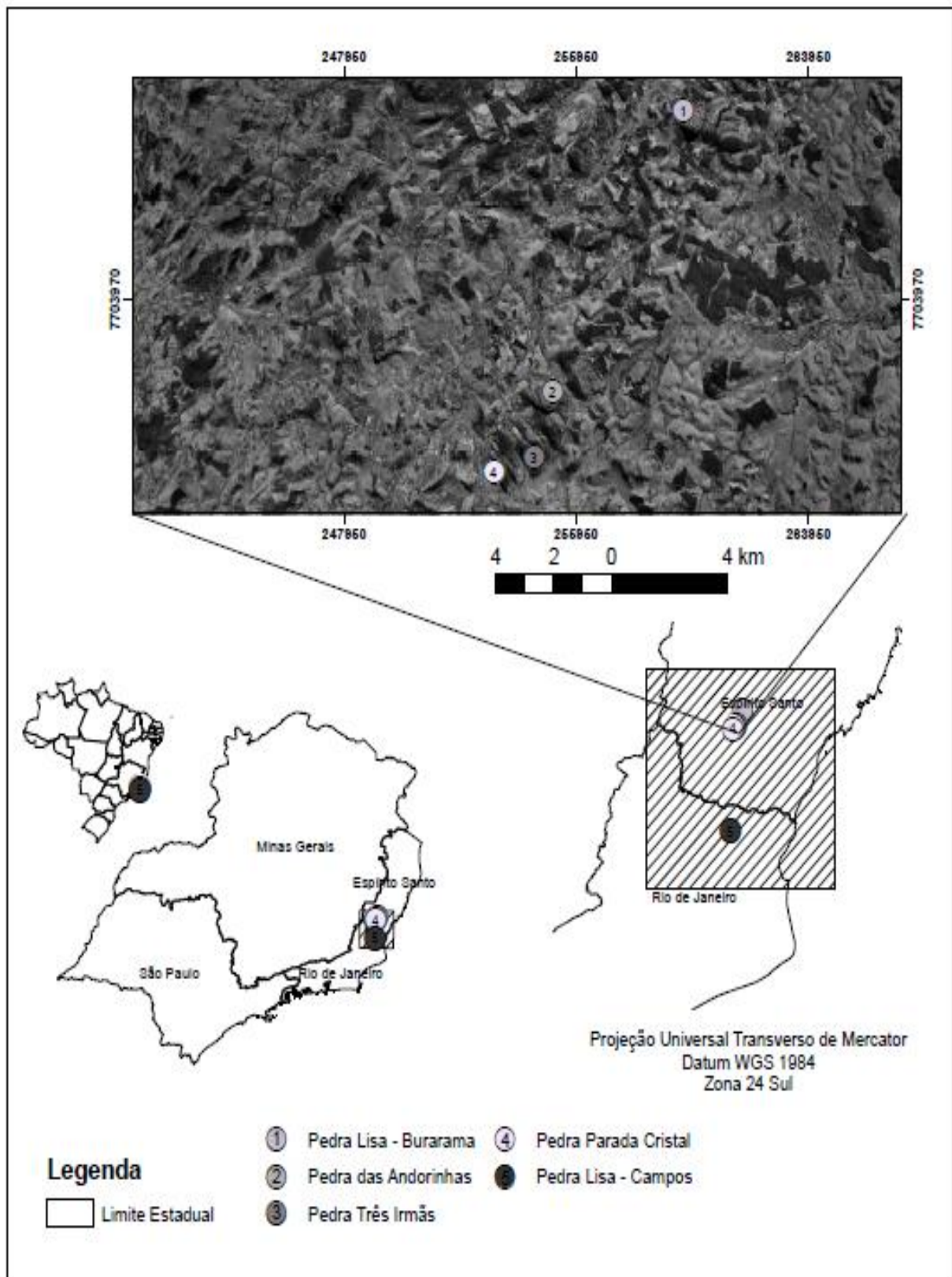


Figura 2. Inselbergues nos quais foram coletadas amostras foliares de indivíduos de *P. azouryi*.

É uma espécie de fácil reconhecimento mesmo em estado estéril, dado que se diferencia das demais espécies do gênero *Pitcairnia* por apresentar lâmina decídua por zona de abscisão acima da bainha e aculeada somente na porção marcescente (Martinelli e Forzza, 2006). A reprodução assexuada ocorre por crescimento clonal através da produção de rametes, enquanto a reprodução sexuada ocorre a partir de sementes (Martinelli & Forzza, 2006). A amostragem deste trabalho inclui indivíduos pertencentes a cinco das sete localidades conhecidas de *P. azouryi* (Tabela 1). Quando encontrados em estado fértil, amostras dos indivíduos foram coletas e prensadas segundo os procedimentos usuais de taxonomia vegetal, e incluídas nas coleções dos herbários MBML e VIES (Thiers, 2014).

Tabela 1 – Populações amostradas. (*m.s.m*), metros sobre o nível do mar; (*N*), número de indivíduos

Localidade e Município	População	Elevação (<i>m.s.m</i>)	coordenadas	<i>N</i>
Pedra Lisa - Burarama, C. Itapemirim	PLB	505	20°42'04" S; 41°18'34" W	15
Pedra das Andorinhas, C. Itapemirim	PA	550	20°46'19" S; 41°21'12" W	12
Pedra Três Irmãs Jerônimo Monteiro	PTI	565	20°47'26" S; 41°21'34" W	13
Pedra Parada Cristal Jerônimo Monteiro	PPC	440	20°47'39" S; 41°22'20" W	13
Pedra Lisa - Campos dos Goytacazes	PLC	595	21°20'36" S; 41°24' 09" W	13

Análise de diversidade e estrutura genética

As amostras foram coletadas em indivíduos pertencentes a touceiras distintas e distantes 5 m umas das outras, evitando a amostragem de clones. Em cada localidade de coleta (i.e., inselbergue) o número de indivíduos amostrados variou de 12 a 15. A distância mínima entre populações foi de 1,3 km [Pedra Parada Cristal (PPC) para Pedra Três Irmãs (PTI)], e a máxima foi de 72 quilômetros [Pedra Lisa – Burarama (PLB) para Pedra Lisa – Campos dos Goytacazes (PLC)]. As folhas coletadas em campo foram acondicionadas em sílica gel e posteriormente congeladas a -20 °C e utilizadas para a extração e purificação de DNA pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1990). Um total de nove marcadores microssatélites previamente desenvolvidos para outras espécies de Bromeliaceae foram utilizados neste estudo. Seis marcadores descritos originalmente para *Pitcairnia albiflos* Herb. (Paggi, 2008): PaA05, PaA09, PaA10, PaB12, PaC05, PaZ01 e três para *P. geyskessi* L.B. Sm. (Sarhou, 2003): Pit6, Pit9, Pit12, foram testados e analisados. Em todos os casos os microssatélites foram amplificados em um volume final de reação de 15µL contendo 2mM de MgCl₂, 10mM/50mM de Tris/KCl pH 8.3, 0,1mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,4 µM de *primer*, 1 unidade de Taq polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo Veriti), nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos constituídos por três etapas: a) 1 minuto a 94 °C, b) 1 minuto a 54°C e c) 1 minuto a 72 °C, com uma etapa final de 7 minutos a 72° C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de acrilamida 6%, em tampão TBE (Tris – 0,89 M, Ácido bórico – 0,89 M e EDTA – 0,02 M), a 100 Volts por aproximadamente três horas. Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

Os genótipos dos loci SSR foram codificados a partir da análise visual dos géis e testados para erros de genotipagem e alelos nulos usando software Microchecker 2.2.3 (*Brookfield* um estimador). Os padrões genéticos dentro das populações foram descritos pelo cálculo dos seguintes parâmetros: (A), número de alelos; (R_s), riqueza alélica; (H_o), heterozigosidade observada; (H_e), heterozigosidade esperada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Os parâmetros de diversidade genética foram estimados com os softwares Genes 2013.1.1 (Cruz, 2008), PopGene 1.32 (Yeh, 1997) e Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995). Para calcular as estimativas de diversidade alélica e teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi usado o software PopGene 1.32 (Yeh, 1997). Para estimar o coeficiente de endogamia (F_{is}) (Weir & Cockerham, 1984), e (G_{is}) (Nei & Chesser, 1983), foi usado o software Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995).

Estatística – F (Weir & Cockerham, 1984) foi utilizada para avaliar os níveis de diversidade genética dentro e entre as populações e para estimar o nível de subdivisão populacional, através dos softwares PopGene 1.32 (Yeh, 1997) e Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995). O grau de diferenciação genética F_{st} (Wright, 1965), G_{st} (Nei & Chesser, 1983) foram efetuados com Fstat 2.9.3 (Goudet, 1995), com teste de significância com 1000 permutações. A elucidação do particionamento da diversidade genética tanto dentro como entre as populações, foi avaliada por análise de variância molecular (AMOVA) realizada com o programa Genes 2013.1.1 (Cruz, 2008), e a significância foi estimada pela estatística R e testados utilizando-se 10 000 permutações.

A formação e delimitação de aglomerados populacionais análogos foram avaliados pelo método de agrupamento Bayesiano através do programa *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para estimativa do número mais provável de grupos genéticos presentes (K), foram utilizados valores de K que variaram de 1 a 8. De acordo com as

frequências alélicas, foi realizado um modelo de mistura usando um período de burn-in de 250 000 repetições e 750 000 réplicas cadeias de Markov Monte Carlo, com 20 iterações por K para corroborar a homogeneidade das estatísticas de acordo com (Pritchard et al., 2000). O método de agrupamento (K) proposto por Evanno et al. (2005) foi empregado baseado na medida do melhor ΔK , a partir do software online *HARVESTER* v 0.6.9.4 (Earl & von Holdt, 2012).

O fluxo gênico indireto foi calculado pela fórmula $Nm = 0.25(1/F_{st} - 1)$ (Wright 1921, 1922), caracterizando as cinco populações e também comparando as populações duas a duas.

Análise de Citometria de Fluxo (FCM)

O mensuramento do conteúdo de DNA nuclear (2C) teve como padrão primário *Solanum lycopersicum* L. 'Stupicke' (padrão de referência para FCM, 2C = 2,00 pg; Praça-Fontes et al. 2011). Núcleos foram extraídos e isolados simultaneamente de folhas jovens de cada indivíduo de *P. azouryi* (amostra) e de *S. lycopersicum*. Após, as suspensões nucleares foram coradas com solução tampão contendo iodeto de propídeo (Otto 1990; Praça-Fontes et al. 2011; Favoreto et al 2012). As suspensões foram analisadas com citômetro Partec PAS (Partec GmbH, Munster, Germany), equipado com fonte laser (488 nm). Os parâmetros do citômetro de fluxo foram pré-determinados, baseado na análise isolada do padrão primário (*S. lycopersicum* "Stupicke") e de uma das amostras de *P. azouryi*. Foram realizadas seis repetições independentes, apresentando mais de 10.000 núcleos em cada análise. O valor do conteúdo médio de DNA nuclear foi calculado dividindo-se o ponto médio do canal do pico de fluorescência G0/G1 do padrão primário pelo ponto médio do canal do pico G0/G1 de cada amostra. O valor médio do tamanho do

genoma foi convertido de (picogramas – pg) em pares de bases pb, considerando que 1 pg de DNA correspondem a $0,978 \times 10^9$ pb (Doležel et al., 2003).

Análise Citogenética (AC)

O material para análise citogenética foi obtido através de sementes de *P. azouryi* que foram coletadas em dois inselbergues da Floresta Atlântica, nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, e germinadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), suplementado com 30 g l⁻¹ de sacarose e 7,0 g l⁻¹ de ágar. Raízes de plântulas de *P. azouryi* com cerca de 1.0 – 2.0 cm de comprimento foram excisadas e tratadas com agente de inibição de microtúbulos amiprofos-methyl (APM, Nihon Bayer Agrochem K. K.®) com concentração final de 3 ou 4 µm por um período de 4 horas. Posteriormente, as raízes foram lavadas com água destilada durante 20 minutos e em seguida, fixadas em solução metanol: ácido acético (Merck®) (3:1). A substituição do fixador ocorreu em três momentos, e as amostras foram armazenadas a -20 °C. As raízes foram lavadas e incubadas durante 2h, 2h 30 min, 2h 45 min e 3h, a 34 °C, em solução de pectinase (Sigma®) nas proporções de 1:5, 1:8, 1:10, 1:12, 1:13, 1:14 ou 1:15 (enzima:água). Decorrente esse procedimento, as raízes foram lavadas durante 10 min em água destilada, fixadas e armazenada a -20 °C (Carvalho et al. 2007; Nunes et al. 2013). A preparação das lâminas foi realizada pela técnica de dissociação do meristema radicular. As lâminas foram secas ao ar e em placa aquecedora a 50 °C (Carvalho et al.2007). Subsequentemente, as lâminas foram coradas com solução 5% de Giemsa (Merck®) em tampão fosfato (pH 6,8) durante 20 min, lavadas duas vezes em água destilada e secas ao ar, e posteriormente colocadas numa placa aquecedora a 50 °C por 5 min. As imagens dos cromossomos metafásicos

foram capturadas por meio da câmera CCD Media Cybernetics® Camera Evolution™, acoplada a um microscópio Nikon 80i (Nikon, Japão).

Resultados

Análise de diversidade genética

Os nove marcadores geraram produtos de amplificação satisfatórios e polimórficos, sendo que quatro destes apresentaram alelos nulos (PaA05, PaA09, PaB12 e Pit9), que foram identificados e corrigidos com o auxílio do *software* Microchecker 2.2.3 (*Brookfield* um estimador). O número de alelos por loco (A) variou entre 2 (PaA10, PaZ01, Pit6, Pit12) e 8 (PaB12) com média de 4,4 alelos por loco. O valor médio de riqueza alélica (R_s) foi de 3,221. Os valores para a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variaram entre 0,262-0,746 e 0,361-0,758 respectivamente. Nenhum dos loci em estudo se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,01$). A média dos valores dos índices de fixação foram $G_{is} = 0,126$ e $F_{is} = 0,094$ (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos parâmetros genéticos dos nove marcadores microssatélites. A = número de alelos, R_s = Riqueza alélica, H_o = Heterozigosidade observada, H_e = Heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg, F_{is} = Índice de fixação, F_{st} = Diferenciação genética dentro, G_{st} = análogo de F_{st} , G_{is} = Coeficiente de endogamia – Nei 197. (* $P < 0.005$).

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>R_s</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{is}</i>	<i>G_{is}</i>
PaA05	7	4.682	0.637	0.686	0.031*	0.071*
PaA09	7	3.854	0.718	0.669	-0.112*	-0.073*
PaA10	2	1.971	0.296	0.361	0.142*	0.181*
PaB12	8	4.942	0.394	0.73	0.421*	0.461*
PaC05	7	4.799	0.746	0.758	-0.01*	0.016*
PaZ01	2	1.996	0.331	0.4	0.133*	0.173*
Pit6	2	1.800	0.526	0.379	-0.425*	-0.389*
Pit9	5	2.958	0.344	0.531	0.301*	0.353*
Pit12	2	1.994	0.262	0.398	0.301*	0.342*
média	4,4	3.221	0.472	0.545	0.094	0.126

A heterozigosidade observada e esperada por população variou de 0,438 – 0,527 e 0,440 – 0,552, respectivamente. Estes valores demonstram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,01$) para todas as populações. A população de PLB teve a maior riqueza alélica (3,391), e, juntamente com PTI, apresentou a maior diversidade genética (0,578). A população de PLC apresentou os menores valores para riqueza alélica, diversidade gênica, heterozigosidade esperada e índice de fixação. O maior valor do índice de fixação (F_{is}) foi 0,208 na população de PLB. A diferenciação genética entre as 5 populações foi alta ($F_{st} = 0,188$, $G_{st} = 0,163$), todos foram significativos ($p < 0,01$). (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos parâmetros genéticos dos nove marcadores microssatélites dentro de cada população. N = número de indivíduos, R_s = riqueza alélica, H' = Diversidade genética H_o = Heterozigosidade observada, H_e = Heterozigosidade esperada, F_{is} = índice de fixação. (* $P < 0.005$).

População	Elevação (m.s.m)	N	R_s	H'	H_o	H_e	F_{is}
PLB	505	15	3.391	0.578	0.457	0.552	0.208*
PA	550	12	3.311	0.542	0.468	0.513	0.136*
PTI	565	13	3.150	0.578	0.462	0.546	0.184*
PPC	440	13	3.305	0.572	0.527	0.546	0.078*
PLC	595	13	2.952	0.459	0.438	0.44	0.047*

A estruturação genética populacional avaliada pela AMOVA mostra 29,23 % de variância genética entre as populações e 70,76 % dentro das populações (Tabela 4). A Análise Bayesiana indicou que um modelo de $k = 3$ populações é capaz de captar melhor a variação nos dados relativos à estruturação genética (Figuras 3 e 4). No primeiro agrupamento estão Pedra Lisa – Burarama (PLB) e Pedra Três Irmãs (PTI). O segundo agrupamento foi formado por Pedra das Andorinhas (PA) e Pedra Parada Cristal (PPC). O terceiro é representado pela população mais divergente de Pedra Lisa – Campos (PLC).

Tabela 4. Amova das cinco populações de *P. azouryi*.

Componentes de variância	Estimativa	Porcentagem
Entre	0.281	29.233
Dentro	0.681	70.767
Total	0.962	100.0

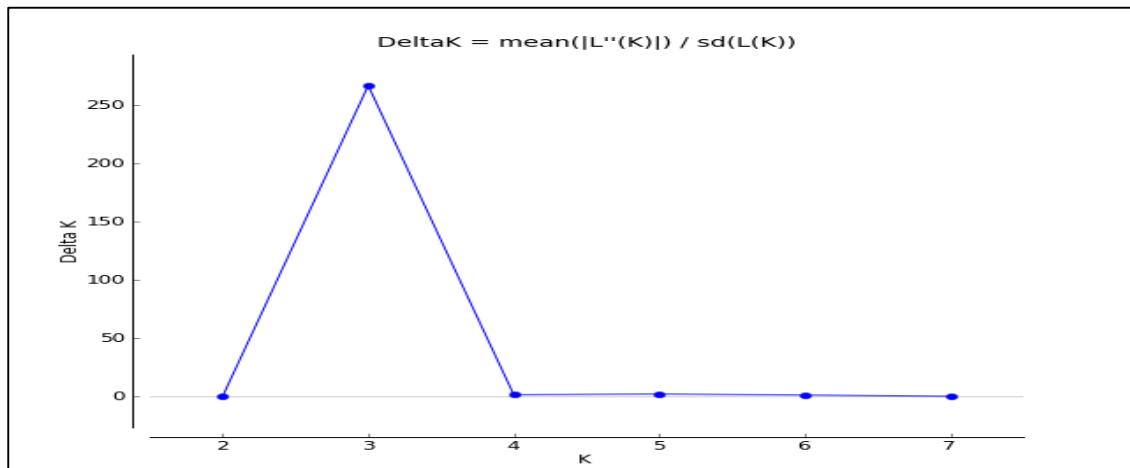


Figura 3. Gráfico do método de agrupamento demonstrando o melhor ΔK .

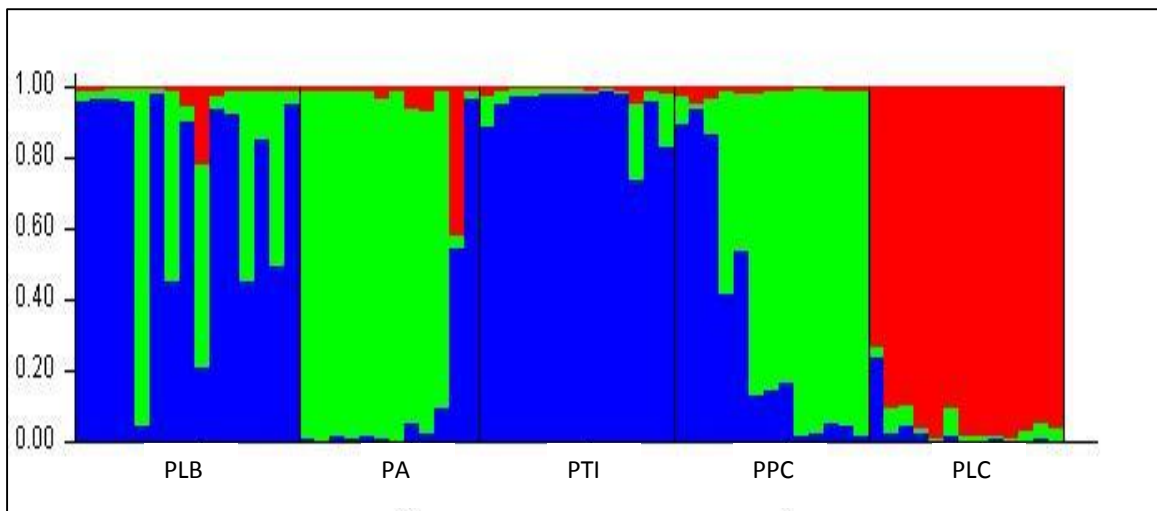


Figura 4. Resultados da análise bayesiana de 66 indivíduos de cinco populações de *P. azouryi*, ocorrentes em inselbergues da Floresta Atlântica do sudeste do Brasil, baseado em nove loci microssatélites. Representação gráfica das diferentes misturas genéticas para $K=3$. As populações estão separadas por barras verticais.

A média de fluxo gênico entre as cinco populações foi de $N_m = 1,073$ migrantes por geração, sendo o maior fluxo entre as PLB e PPC, ($N_m = 3,65$). As populações que apresentaram o menor valor de migrantes foram PTI e PLC com $N_m = 0,55$.

Análise de FCM

As análises de FCM evidenciaram picos de fluorescência de núcleos de G0/G1 de *P. azouryi* e *S. lycopersicum* com coeficiente de variação (CV) menor que 2.46%. Por meio da comparação entre os pontos médios dos picos G0/G1 de cada amostra e do padrão interno, o valor médio 2C para *P. azouryi* foi de $1,16 \pm 0,013$ pg ($1,13 \times 10^9$ pb). Diferentemente, alguns indivíduos da população de PLC apresentaram valor médio de $2C = 2,32 \pm 0,025$ pg ($2,27 \times 10^9$ pb), exatamente o dobro do conteúdo de DNA nuclear apresentado pelos indivíduos das outras populações e da própria PLC (Figura 5).

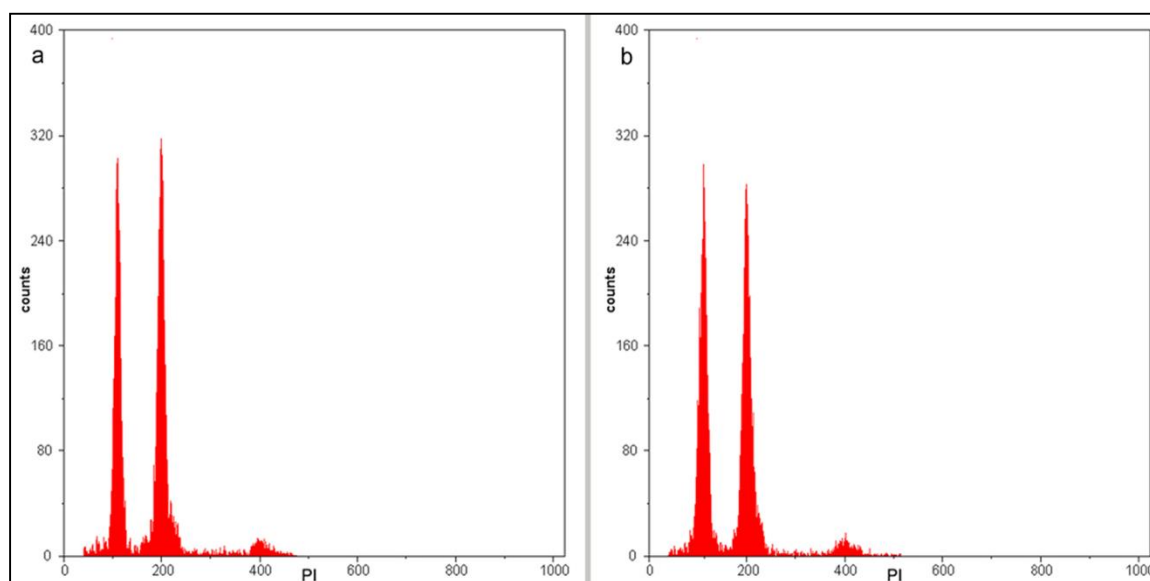


Figura 5. Histogramas representativos do mensuramento do conteúdo de DNA de *P. azouryi*. a) Histograma apresentando os picos G0/G1 de *P. azouryi* PLB no canal 116 ($2C = 1,16$ pg) e de *S. lycopersicum* no canal 200 (padrão, $2C = 2,00$ pg). b) Histograma apresentando os picos G0/G1 de *P. azouryi* PTI no canal 100 (controle, $2C = 1,16$ pg) e de *P. azouryi* PLC no canal 200 (padrão, $2C = 2,32$ pg).

Análise Citogenética

As análises citogenéticas revelaram que a maioria dos indivíduos das cinco populações possui número de cromossomos equivalente a $2n = 50$. Porém, alguns indivíduos da população de PLC apresentaram conteúdo $2C = 2,32$ equivalente a $2n = 100$ cromossomos. Portanto, o número cromossômico dos indivíduos amostrados explica os resultados obtidos a partir de citometria de fluxo (Figura 6).

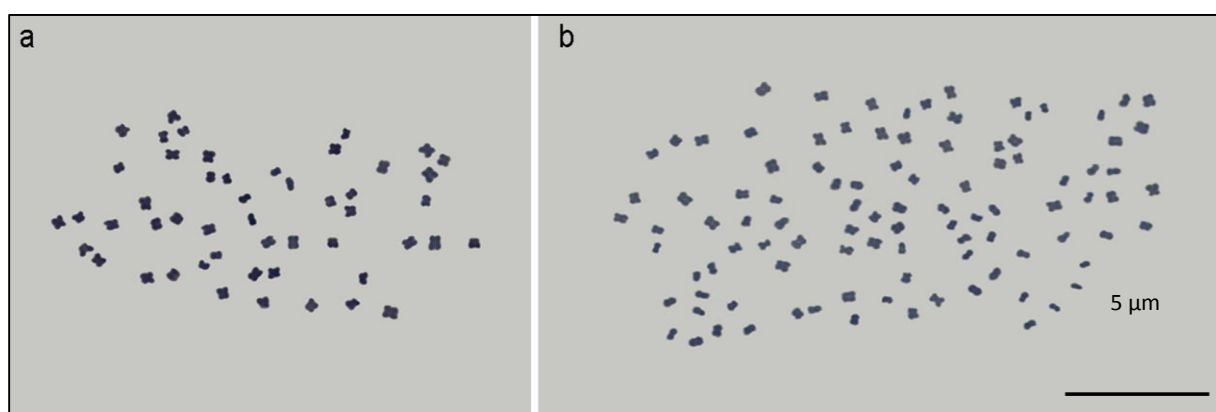


Figura 6. Metáfases de *P. azouryi* apresentando (**a**) $2n = 50$ (PPC) e (**b**) $2n = 100$ cromossomos (PLC). Os cariótipos são constituídos por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, relativamente pequenos.

Discussão

Em relação aos padrões de diversidade genética em *Pitcairnia azouryi*, os valores encontrados em todos os loci para heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) são similares a outras espécies de Bromeliaceae rupícolas e de inselbergues da Floresta Atlântica, como *Alcantarea imperialis* (Carrière), *A. geniculata* (Wawra) JR Grant (Barbará et al., 2007a) e *Pitcairnia flammea* Lindl. (Miranda et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com *Vriesea gigantea* Gaudich (Palma-Silva et al., 2009) e *Bromelia antiacantha* Bertoloni (Zanella et al., 2011), todas elas pertencentes a

Floresta Atlântica. Em todos os estudos citados acima e da mesma forma no presente trabalho, a heterozigosidade observada (H_o) foi menor que o esperado para o EHW, relacionando ao déficit de heterozigotos ou excesso de homozigotos. Estes resultados podem ser atribuídos a autofecundação, ou aos cruzamentos entre indivíduos aparentados, o que pode ser explicado pela distribuição espacial agregada em touceiras ou reprodução através do hábito clonal.

Com relação aos valores do número de alelos (A), riqueza de alelos (R_s), os resultados identificados neste trabalho são inferiores ao encontrados em outros estudos de genética de populações com representantes de Bromeliaceae (Barbará et al., 2007a, 2009 Palma-Silva et al., 2009, 2011). Estes valores inferiores podem ser resultantes da transferência dos loci microssatélites originalmente desenvolvidos para outras espécies de *Pitcairnia* (Barbará et al., 2007b). Essas diferenças também podem se dever às diferentes metodologias utilizadas por cada autor, ou por variações no número de repetições em tandem dos loci testados (Wang et al., 2009). Outro fator que pode influenciar nos padrões genéticos populacionais de *P. azouryi* é distribuição espacial dos indivíduos, que ocorre de forma localmente restrita e disjunta nos diferentes inselbergues. Esta distribuição eleva o efeito de deriva genética aleatória e, conseqüentemente, aumenta o risco de endogamia dentro da população (Templeton, 1980; Hedrick, 2005), reduzindo a variabilidade genética (Honnay e Jacquemyn 2007).

As populações de *P. azouryi* apresentaram uma subdivisão populacional alta ($F_{st}=0,188$). Este valor é superior aos encontrados em outros trabalhos com representantes de Bromeliaceae (Tabela 5). A análise de variância molecular revelou que 29,23 % da variância genética encontra-se entre as populações e 70,76 % dentro das populações, valor próximo ao encontrado em outros estudos como Barbará et al. (2009) em *Alcantarea*

glaziouana (Lem.) Leme (22% entre e 78% dentro) e *A. regina* (Vell.) Harms (20% entre e 80% dentro), Palma-Silva et al. (2009) em *Vriesea gigantea* (21,03% entre e 78,97%) porém, acima dos valores encontrados por Barbará et al. (2007a) em *A. geniculata* (11% entre e 89% dentro) e Lavor et al. (2014) em *V. minarum* L.B. Sm. (8,85% entre e 91,15% dentro), e inferior aos valores encontrados por Barbará et al. (2007a) em *A. imperialis* (44% entre e 56% dentro). A maioria desses estudos foi realizada em afloramentos rochosos com exceção de *V. gigantea*, uma espécie epífita da Floresta Atlântica. As diferenças encontradas no presente trabalho, em relação aos outros estudos populacionais realizados com espécies de Bromeliaceae, provavelmente se devem à distribuição espacial de *P. azouryi*. Nesta espécie, populações localmente agregadas nos inselbergues se encontram isoladas umas das outras, diminuindo o fluxo gênico entre as populações. Consequentemente, esta característica conduz para uma alta intensidade dos efeitos de deriva genética, resultando na alta estruturação populacional entre as áreas amostradas.

Tabela 5. Estrutura populacional e distribuição geográfica de espécies de Bromeliaceae estudadas usando marcadores microssatélites.

Espécies	Média F_{st}	Distribuição Geográfica	Nº de populações	Referência
<i>Alcantarea geniculata</i>	0.111	Rio de Janeiro, Brasil	4	Barbará et al. 2007a
<i>Alcantarea imperialis</i>	0.434	Rio de Janeiro, Brasil	4	Barbará et al. 2007a
<i>Alcantarea glaziouana</i>	0.217	Rio de Janeiro, Brasil	5	Barbará et al. 2009
<i>Alcantarea regina</i>	0.195	Rio de Janeiro, Brasil	2	Barbará et al. 2009
<i>Vriesea gigantea</i>	0.211	Sul e Sudeste do Brasil	13	Palma-Silva et al, 2009
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	0.156	Guiana Francesa e Suriname	14	Boisselier-Dubayle et al., 2010
<i>Bromelia antiacantha</i>	0.224	Sudeste do Brasil	8	Zanella et al., 2011
<i>Pitcairnia albiflos</i>	0.336	Rio de Janeiro, Brasil	5	Palma-Silva et al, 2011
<i>Pitcairnia staminea</i>	0.26	Rio de Janeiro, Brasil	5	Palma-Silva et al, 2011
<i>Vriesea minarum</i>	0.088	Minas Gerais, Brasil	12	Lavor et al., 2014
<i>Pitcairnia azouryi</i>	0.188	Espírito Santo, Brasil	5	Manhães et al. este artigo

Os conjuntos de dados com suporte mais robusto estabelecido pelo *Structure* 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), revelou um K=3 conjuntos populacionais formados por PLB e PTI em um *cluster*, PA e PPC em outro *cluster*, ficando PLC em um *cluster* separado. Na formação dos três grupos genéticos, dois foram incluídos no Espírito Santo, provavelmente pela proximidade de alguns inselbergues e/ou à ação de dispersão de sementes e na ação de seus agentes polinizadores. O último grupo foi estabelecido no estado do Rio de Janeiro, que apresenta a população mais distante geograficamente em relação às outras populações (63 km). Isto forma uma barreira para a dispersão de sementes e pólen, além da troca de genes por polinizadores, levando ao isolamento por distância e com isso aumentando os efeitos de diferenciação através da deriva genética aleatória. Estes resultados corroboram com os valores de F_{st} , onde a população de PLC apresentou os maiores valores comparando as populações duas a duas. (dados não apresentados).

O fluxo gênico indireto entre as cinco populações foi considerável, com média de $Nm = 1.073$ migrantes por geração. Comparando as populações duas a duas, a população de PLC foi a única que apresentou valor de $Nm < 1$, comparando-a com as outras quatro populações (dados não apresentados), corroborando com os resultados de estrutura populacional. O baixo fluxo gênico entre PLC e as outras quatro populações reforçam os resultados de diferenciação de F_{st} , mostrando que o fluxo gênico ocorre com nível satisfatório somente entre populações do Espírito Santo.

As populações de PLB e PPC apresentaram o maior número de migrantes por geração ($Nm = 3.65$), apesar de não serem as mais próximas geograficamente entre as quatro populações do estado do Espírito Santo. A relação observada nesse estudo entre o fluxo gênico e a estruturação genética nas localidades de PLB e PPC possivelmente é atribuída às forças evolutivas como deriva genética e eventos de seleção. Outro fator que

pode influenciar são gargalos recentes decorrente do surgimento e expansão de novas populações através de poucos indivíduos causando o efeito fundador (Barrett e Kohn, 1991; Karron 1991). A influência desse processo reduz e acelera a perda da variabilidade genética (Honnay e Jacquemyn 2007) aumentando o risco de endogamia (Templeton 1980; Hedrick 2005). Além disso, a condição de ocorrência de populações isoladas e subdivididas pode levar a diferenciação genética de populações locais (Tero et al., 2003). Essa relação observada entre o fluxo gênico e a estruturação genética podem ser um indicativo de que as populações de *P. azouryi* não estão em equilíbrio entre o fluxo gênico e deriva genética, podendo tornar a estimativa indireta do fluxo gênico via F_{st} difícil (Whitlock, 1992). Este fato demonstra que apesar da espécie possuir sementes aladas, caracterizando a síndrome de dispersão pelo vento (anemocoria), a dispersão de propágulos é mais eficaz a curtas distâncias pelo fato dessas populações estarem inseridas num raio de 12 km, ou devido à ação de seu agente polinizador que até o momento é desconhecido. Ademais, algumas populações de *P. azouryi* apresentaram floração em épocas diferentes do ano em suas áreas de ocorrência (observação pessoal). Nos anos de 2012 e 2013, indivíduos de PA apresentaram floração no mês de dezembro, PLC no mês de Agosto e na população de PLB no mês de Abril, as outras duas populações não foram encontradas férteis na época da coleta.

Além disso, nas espécies que formam naturalmente populações pequenas a polinização pode ser mais efetiva entre as populações como mencionado por (Ellstrand e Elam 1993). No entanto, em plantas com crescimento clonal ocorre a formação de aglomerados através de rametes, apresentando floração de forma agrupada (Charpentier, 2002). Esta característica pode influenciar o comportamento dos polinizadores, causando deslocamentos curtos entre inflorescências próximas, reduzindo a distância média de

dispersão de pólen (Richards, 1997) e com isso aumentando a estrutura populacional em escala local (Alberto et al., 2005; Ohsako 2010).

A ação comportamental dos polinizadores geralmente determina a distância em que o pólen será transportado (Loiselle et al 1995; Dick et al 2008). Além disso os modelos demográficos das populações e sua fenologia influenciarão a distância de dispersão dos pólenes (Degen et al., 2004;. Dick et al., 2008). Estes resultados demonstram a necessidade de estudos mais detalhados a respeito da biologia reprodutiva e floral, dispersão de propágulos e agentes polinizadores para a identificação precisa dos responsáveis por esses fatores.

O valor médio do conteúdo de DNA nuclear de *P. azouryi* ($2C = 1,16$ pg), apresentado pela maioria dos indivíduos das cinco populações, corrobora com os valores reportados para a família Bromeliaceae. Assim como encontrado para *P. azouryi*, os dados de FCM têm evidenciado que essa família é composta por espécies que possuem conteúdo de DNA nuclear relativamente baixo (Leitch et al. 2010; Nunes & Clarindo 2014). Entretanto, os valores $2C$ reportados concernem principalmente espécies do gênero *Pitcairnia*. Os trabalhos mostraram uma variação do tamanho do genoma nuclear, oscilando de $2C= 0,60$ para *P. feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed (Ebert e Till 1997) a $2C= 1,44$ para *P. flammea* (Nunes et al. 2013). Portanto, *P. azouryi* possui conteúdo de DNA nuclear similar a outras espécies do gênero.

A exceção a estes resultados se encontra na população de PLC, a mais distante geograficamente, onde foram identificados indivíduos com valor $2C= 2,32$ pg. Esse resultado mostrou que há variação intraespecífica do tamanho do genoma entre os indivíduos dessa localidade. Resultados semelhantes foram encontrados para a espécie *Aechmea eurycorymbus* Harms (Bromelioideae) que apresentou um valor $2C= 2,19$ pg,

aproximadamente o dobro de outras espécies do mesmo gênero (Gitai et al., 2014). Portanto, os dados de FCM mostram que há indivíduos com diferentes números cromossômicos na população PLC.

Assim como para a maioria das espécies da família Bromeliaceae (Cotias-de-Oliveira et al., 2000; Palma-Silva et al. 2004; Gitai et al. 2005; Ceita et al.2008; Gitai et al. 2014), todos os indivíduos de *P. azouryi* das populações PLB, PA, PTI e PPC, e alguns indivíduos da população PLC apresentaram número cromossômico $2n = 50$. Todos os indivíduos com $2n = 50$ cromossomos foram gerados a partir de sementes coletadas de plantas com conteúdo de DNA $2C = 1,16$ pg. Corroborando com os dados de FCM, metáfases com $2n = 100$ cromossomos foram obtidas dos meristemas radiculares das sementes coletadas das plantas com $2C = 2,32$ pg.

Em estudos com espécies da subfamília Pitcairnioideae, pertencentes aos gêneros *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Fosterella*, *Hechtia*, *Lindmania*, *Puya* e *Pitcairnia*, diversos autores reportaram que a maioria das 60 espécies estudadas apresentou $2n = 50$ (McWilliams, 1974; Brown et ai, 1984; Brown e Gilmartin, 1989; Marchant, 1967; Sharma e Ghosh,1971, Nunes & Clarindo 2014, Gitai et al, 2014) e apenas duas espécies revelaram $2n = 100$ cromossomos (McWilliams, 1974; Brown et ai, 1984; Brown e Gilmartin, 1989; Marchant, 1967; Sharma e Ghosh,1971; Gitai et al, 2014). A variação no tamanho do genoma nuclear e no cariótipo de alguns indivíduos de PLC evidencia a ocorrência de poliploidia em *P. azouryi*. Em associação com as características morfológicas e ecológicas, os dados de FCM e citogenéticos indicam que os indivíduos com $2C = 2,32$ pg e $2n = 100$ cromossomos são autopoliploides. A autopoliploidia consiste na duplicação do complemento cromossômico (euploidia) como consequência da ocorrência de endomitose

ou endorreduplicação no zigoto ou da formação e fusão de células reprodutivas não-reduzidas (Grant, 1981; Guerra, 2008; Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2011).

Os resultados deste estudo são semelhantes ao encontrado por Gitai et al. (2014) para *P. flammea* que apresentou $2n = 50 / 2n \approx 100$, *P. sceptrigera* Mez $2n = 50 / 2n \approx 100$ e *P. breedlovei* L.B. Sm. ($2n = 48 / 2n \approx 94$). Os autores reportaram que o aumento do número cromossômico pode ser atribuído a endopoliploidização, um processo de replicação do DNA mitótico em células somáticas sem a divisão celular. As espécies do gênero *Pitcairnia* geralmente estão associadas a ambientes xéricos, caracterizados pela pouca disponibilidade de água e alto grau de insolação (Barow & Meister, 2003). Essas condições ambientais podem interferir no controle do ciclo celular, acarretando num evento de autoploidização. Portanto, o microclima e micro-habitat podem estar influenciando os processos evolutivos em PLC, única população geograficamente isolada das demais. Essas mudanças estão gerando organismos com diferentes números cromossômicos ($2n = 50$ e $2n = 100$), o que pode culminar no isolamento reprodutivo. Visto que o número básico de cromossomos da família Bromeliaceae é equivalente a $x = 25$ (Gitai et al. 2014, Nunes & Clarindo 2014), a ocorrência de plantas com $2n = 100$ cromossomos sugere que os indivíduos de PLC se estabeleceram no local após os indivíduos das demais localidades.

A conservação de *P. azouryi* ao longo de toda a sua distribuição geográfica é prioritária dado que suas populações estão altamente estruturadas geneticamente. A população de PLC, no estado do Rio de Janeiro, que apresenta diferenças genéticas e cromossômicas mais expressivas em relação às outras populações estudadas principalmente pela presença de indivíduos poliploides que podem apresentar diferenças morfológica e/ou fisiológicas de seu progenitor diploide. Estudos futuros em *P. azouryi*

deverão focar na biologia floral, forma de polinização e dispersão de sementes, para compreendermos de forma mais abrangente os processos evolutivos ocorrentes com a espécie.

Referências

- Alberto F, Gouveia L, Arnaud-Haond S, Pérez-Lloréns JL, Duarte CM, Serrão EA. 2005. Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Mol Ecol*. 14:2669–2681.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007a) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol Ecol* 16:1981–1992.
- Barbará T, Palma-Silva C; Paggi GM, Bered F, Fay, MF, and Lexer C (2007b) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: Potential and limitations. *Molecular Ecology* 16 : 3759 – 3767 .
- Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S, Lexer C (2009). Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Ann. Bot.* 103, 65–77.
- Barrett SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk DD, Holsinger KE (eds) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, pp 03–30
- Barow M, Meister A (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell and Environment* 26: 571–584.
- Bellintani MC, Assis JG, Oliveira ALC (2005) Chromosomal evolution of Bromeliaceae. *Cytologia* 70:129–133

- Benzing, D (2000). Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press, London.
- Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C (2010) Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana a test of the forest refuge hypothesis. *Ecography* 33: 175_184,
- Brown GK, Varadarajan GS, Gilmartin AJ (1984). Chromosome numbers reports LXXXV. Bromeliaceae. *Taxon* 33: 756–760.
- Brown GK, Gilmartin AJ (1989). Chromosome numbers in Bromeliaceae. *American Journal of Botany* 76: 657–665.
- Carvalho CR, Clarindo WR, Almeida PM (2007) Plant cytogenetics: still looking for the perfect mitotic chromosomes. *Nucleus* 50:453–462.
- Ceita GO, Assis JGA, Guedes MLS, Cotias-de-Oliveira ALPC (2008) Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. *Bot J Linn Soc* 158:189–193. doi:10.1111/j.1095-8339.2008.00776.x
- Charpentier A (2002) Consequences of clonal growth for plant mating. *Evol Ecol* 15:521–530.
- Clarindo WR, Carvalho CR (2008) First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Syst Evol* 274:237–241. doi:10.1007/s00606-008-0050-y
- Clarindo WR, Carvalho CR, Alves BMG (2007) Mitotic evidence for the tetraploid nature of *Glycine max* provided by high quality karyograms. *Plant Syst Evol* 265:101–107. doi:10.1007/s00606-007-0522-5
- Clarindo WR, Carvalho CR (2008) First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Syst Evol* 274:237–241. doi:10.1007/s00606-008-0050-y

- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Ceita GO, Palmeira ACL, Guedes MLS (2004) Chromosomenumber for Bromeliaceae species occurring in Brazil. *Cytologia* 69:161–166
- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Bellintani MC, Andrade JCS, Guedes MLS (2000) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genet Mol Biol* 23:173–177. doi:10.1590/S1415-47572000000100032
- Coyne JA & Orr HA (2004). *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Cruz CD (2008). *Programa Genes: diversidade genética*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Degen B, Bandou E, Caron H. (2004) Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity (Edinb)*. 93:585–591.
- Dick CW, Hardy OJ, Jones FA, Petit RJ. (2008) Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in Tropical Rain Forest trees. *Trop Plant Biol*. 1:20–33.
- Doležal J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA and genome size of trout and human. *Cytometry* 51:127–128
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
- Earl DA, and Von Holdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER : A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 : 359 – 361 .
- Ebert I, Till W (1997) Nuclear genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) with emphasis on the genus Pitcairnia. Abstracts, angiosperm genome size discussion meeting, 11–12 September, pp 15. Royal Botanical Gardens, Kew
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24:217–242

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611 – 2620 .
- Favoreto FC, Carvalho CR, Lima ABP, Ferreira A, Clarindo WR (2012) Genome size and base composition of Bromeliaceae species assessed by flow cytometry. *Plant Syst Evol* 298:1185–1193. doi:10.1007/s00606-012-0620-x
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JÁ, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L. *Bromeliaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 05 Fev. 2014.
- Gitai, J, Paule J, Zizka G, Schulte K, Benko-Iseppon AM (2014). Chromosome numbers and DNA content in Bromeliaceae: additional data and critical review. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 176, 349–368.
- Gitai J, Horres R, Benko-Iseppon AM (2005) Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Syst Evol* 253:65–80. doi:10.1007/s00606-005-0306-8
- Givnish TJ, Millan KC, Berry PE, Strydom KJ (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. *Aliso* 23:3–26
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Benjamin EEV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Strydom KJ (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eightlocusplastid phylogeny. *Am J Bot* 98:872–895.doi:10.3732/ajb1000059
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate Fstatistics. *J Hered* 86:485–486

- Grant V (1981) *Plant speciation*, 2nd edn. New York: Columbia University Press.
- Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetics and Genome Research* 120: 339–350.
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59, 1633–1638.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T (2011) Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant Journal* 66: 18–33.
- Hmeljevski KV, Reis, MS, Forzza, RC (2015) Patterns of gene flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a monocarpic species of Bromeliaceae from Brazil. *Journal of Heredity* 106 (1): 93-101
- Hmeljevski KV, Freitas L, Domingues R, Pereira AR, Cancio AS, Andrade ACS, Machado MA, Viccini LF, Forzza RC. (2014) Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. *Flora* 209: 250-259
- Honnay O, Jacquemyn H (2007) Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Cons Biol* 21:823–831.
- Karron JD (1991) Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. In: Falk DD, Holsinger KE (eds) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, pp 87–98.
- Lavor P, Van Den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM (2014) Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the iron quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101 (7): 1 – 9.

- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF (2010) Genome size dynamics and evolution in monocots. *J Bot.* doi: 10.1155/2010/862516
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot.* 82:1420–1425.
- Louzada RB, Palma-Silva C, Correia AM, Kaltchuk-Santos E, Wanderley MGL (2010) Chromosome number of *Orthophytum* species (Bromeliaceae). *Kew Bull* 65:53–58. doi:10.1007/s12225-010-9175-6
- Luther HE. (2012). *An alphabetic list of bromeliad binomials*, 13th edn. Sarasota, FL: Marie Selby Botanical Gardens & Bromeliad Society International.
- Marchant CJ (1967) Chromosome evolution in the Bromeliaceae. *Kew Bull* 21:161–168
- Marques AR, Lemos Filho JP, Mota RC (2012) Diversity and conservation status of bromeliads from Serra da Piedade, Minas Gerais, Brazil. *Rodriguésia* 63 : 243 – 255 .
- Martinelli G et al. (2008). Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59(1): p. 209-258.
- Martinelli G & Forzza RC (2006) *Pitcairnia* L'Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L.B. Sm. *Revista Brasil. Bot.*, V.29, n.4, p. 603-607.
- Martinelli G & Moraes MA (2013) Livro vermelho da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://cncflora.jbrj.gov.br> (Acesso em: 17/12/2013)
- McWilliams EL (1974) Bromeliaceae. Chromosome number and evolution. In: Smith LB, Downs RJ, eds. *Flora Neotropica*. New York: Afner Press, 14: 33–40.

- Miranda, FD, Gontijo, ABPL, Santiliano, FC, Favoreto, FC & Soares, TCB (2012).
Transferability and Characterization of Microsatellite Markers in five
Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnioideae and
Bromelioideae. *Biota Neotrop.*12(3).
- Mittermeier, RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J,
Fonseca GAB (2004) Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most
endangered terrestrial ecoregions. CEMEX & Agrupación Sierra Madre, Mexico
City, Mexico.
- Murashige T and Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays
with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB e Kent J (2000)
Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nei M and Chesser RK (1983) Estimation of fixation indexes and gene diversities.
Annals of Human Genetics 47 : 253 – 259 .
- Nunes ACP, Nogueira EU, Gontijo ABPL, Carvalho CR, Clarindo, WR (2013) The first
karyogram of a Bromeliaceae species: an allopolyploid genome. *Plant Syst Evol.*
299:1135–1140.
- Nunes ACP, Clarindo WR (2014) Karyotype characterization and nuclear DNA content
measurement in Bromeliaceae: State of the art and future perspectives. *Anais da
Academia Brasileira de Ciências.*86(4): 1849-1861.
- Ohsako T (2010) Clonal and spatial genetic structure within populations of a coastal
plant, *Carex kobomugi* (Cyperaceae). *Am J Bot.* 97:458–470.

- Otto FJ (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Robinson JP (eds) *Methods in cell biology*, vol 33. Academic Press, San Diego, pp 105–110
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Resources*, v.8, p.980–982
- Palma-Silva C, Santos DG, Kaltchuk-Santos E, Bodanese-Zanettini MH (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Bot* 91:804–807. doi:10.3732/ajb.91.6.804
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2006) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbara T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103:503–512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* 20 : 3185 – 3201 .

- Petit RJ & Excoffier L (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (7): 386-393.
- Porembski S, Martinelli G, Ohlemüller R, Barthlott W (1998) Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Divers. Distr.* 4, 107–119.
- Praça-Fontes MM, Carvalho CR, Clarindo WR, Cruz CD (2011) Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Rep* 30:1183–1191. doi:10.1007/s00299-011-1026-x
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 : 945 – 959 .
- Ramírez-Morillo IM, Brown GK (2001) The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Syst Bot* 26:722–726. doi:10.1043/0363-6445-26.4.722
- Richards AJ (1997) *Plant breeding systems*, 2nd edn. George Allen & Unwin, London
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J, Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes*, v.3, p. 221-223.
- Schulte K, Barfuss MHJ, Zizka G (2009) Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Mol Phylog Evol* 51:327–339. doi:10.1016/j.ympev.2009.02.003

- Sgorbati S, Labra M, Grugni E, Barcaccia G, Galasso G, Boni U, Mucciarelli M, Citterio S, Irama'tegui AB, Gonzales LV, Scannerini S (2004) A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biol* 6:222–230. doi:10.1055/s-2004-817802
- Sharma AK, Gosh I. (1971) Cytotaxonomy of the family Bromeliaceae. *Cytologia* 36: 237–247.
- Smith LB & Downs RJ (1974) *Flora Neotropica*, Monograph No.14, Part 1, Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York. p.1-658.
- Smith LB & Downs, RJ (1977) *Flora Neotropica*, Monograph No.14, Part 2, Tillandsioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York, p.663-1492.
- Smith LB & Downs RJ (1979) *Flora Neotropica* Monograph No.14, Part 3, Bromelioideae (Bromeliaceae). Hafner Press, New York, p.1493-2142.
- Templeton AR (1980) The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* 94:1011–1038.
- Tero N, Aspi J, Siikamaki P, Jakalaniemi A, Tuomi J (2003) Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Mol Ecol* 12:2073–2085.
- Thiers, B. [continuamente atualizado]. Índice Herbariorum: Um diretório global de herbários pública e pessoal associado. Herbário Virtual do Jardim Botânico de Nova Iorque. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>. Acesso em: 01 Dec 2014
- Versieux, LM, Elbl PM, Wanderley MGL, Menezes NLD (2010a) *Alcantarea*(Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. *Nordic Journal of Botany* 28 : 385 – 397 .

- Wang X, Rinehart TA, Wadl PA, Spiers JM, Hadziabdic D, Windham MT & Trigiano RN (2009) A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 2432-2436.
- Weir B and Cockerham C (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 : 1358 – 1370 .
- Whitlock C (1992) Vegetational and climatic history of the pacific northwest during the last 20,000 years: implications for understanding present-day biodiversity. *The Northwest Environmental Journal*, 8:5—28
- Wright S (1921) Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Wright S (1922) Coefficients of inbreeding and relationship. *Am. Nat.* 56: 330-338.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F –statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19 : 395 – 420 .
- Yeh FC, Yang RC, Boyle BJ, Ye ZH and Mao JX (1997) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada*
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 98:1511–1519.

Conclusão Geral

Pitcairnia azouryi era conhecida anteriormente por apenas três locais de ocorrência. Após este estudo foram ampliadas para sete localidades com a presença da espécie, cinco no estado do Espírito Santo e duas no estado do Rio de Janeiro. Através de exaustivo trabalho de campo para a localização de novas populações, e análise ocupação espacial destas populações e distância entre elas, a espécie é categorizada neste trabalho como ameaçada (EN) segundo os critérios da IUCN. Esta categoria justifica-se pela a área de ocupação restrita de suas populações, pelo número de populações conhecidas e pelo fato de que nenhuma de suas áreas de ocorrência está incluída em unidade de conservação.

A técnica de transferibilidade de marcadores moleculares microssatélites é uma forma prática e menos onerosa de investigar a diversidade e a estrutura genética de populações, além de diminuir o tempo necessário com a elaboração de *primers* específicos. A transferência de marcadores microssatélites desenvolvidos para *P. albiflos* e *P. geyskessi* foi eficaz. Dos 14 *primers* testados, nove apresentaram resultados com polimorfismos satisfatórios. O nível de transferibilidade obtido foi considerado alto, uma vez que 64% dos 14 *primers* forneceram resultados positivos.

Os níveis de heterozigosidade observada e esperada, e os níveis de estruturação genética populacional são semelhantes àqueles outras espécies de Bromeliaceae que ocorrem em afloramentos rochosos da Floresta Atlântica. A variância genética revelada pela AMOVA evidenciou que 29.23% ocorre entre as populações e 70.76% dentro das populações. As análises bayesianas revelaram $K=3$ conjuntos populacionais representando de forma mais clara a variação genética ocorrente nas populações. Este

resultado foi atribuído ao isolamento das populações do RJ em relação às do ES, e pelas populações de uma maneira geral se distribuírem de forma disjunta, dificultando a dispersão de propágulos e interferindo no comportamento dos polinizadores.

O conteúdo médio de DNA nuclear mensurado por citometria de fluxo reflete diferenças no número de cromossomos dos indivíduos dentro de uma mesma população de *P. azouryi*. A diferença encontrada na população de Campos dos Goytacazes - PLC (indivíduos diploides e poliploides) pode se dever ao seu isolamento desta população em relação às demais do ES, e/ou pela pressão ambiental dos microclimas e micro habitats distintos daqueles dos demais locais de ocorrência da espécie.