

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**Conservação, diversidade e estrutura genética de populações de *Dyckia*
leptostachya Baker (Bromeliaceae)**

BRENDA BAÍA BRANDÃO

Campo Grande – MS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

**Conservação, diversidade e estrutura genética de populações de *Dyckia*
leptostachya Baker (Bromeliaceae)**

BRENDA BAÍA BRANDÃO

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Biologia Vegetal junto ao
Instituto de Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi – UFMS/CPAN

Campo Grande – MS
2017

Dedico esta dissertação, aos meus pais, Ana e Damião, por todo amor, confiança,
paciência e apoio nesta jornada.

E como não poderia deixar esquecer, dedico esta dissertação ao meu filho Arthur que
em tão pouco tempo me tornou mais forte e me mostrou o verdadeiro significado do
amor incondicional.

Agradecimentos

A Deus por atender meus pedidos de saúde e proteção.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi, pela orientação, críticas, apoio e compreensão, principalmente nos últimos meses do mestrado, com a chegada do meu filho.

A amiga que a graduação me apresentou e que o estágio no laboratório de genética estreitou os laços, Gislaine Moreira de Miranda, obrigada pela amizade e parceria desde o início, de quando iniciamos os estudos de diversidade genética sem saber aonde isso iria nos levar, e que bom que nos levou ao mestrado.

Aos meus parceiros de laboratório e queridos amigos Analice Paula de Sousa Campelo e Diego Finati Alves, pela companhia, apoio, amizade e torcida.

A todos os colegas do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* do Pantanal.

A Fernanda Maria de Russo Godoy pela disponibilidade e paciência em me ajudar a executar os terríveis programas de diversidade genética.

Ao casal Gabriel Faggioni e Luciana Vicente da Silva pela ajuda com as PCRs e principalmente pelas relevantes discussões relacionadas ao meu projeto.

Aos técnicos de laboratório: Emílio Flores e Carla Braga Leite pelo suporte técnico.

À equipe do Laboratório de Evolução e Biodiversidade (LEBio), principalmente a Prof.^a Dr.^a Aline Pedroso Lorenz Lemke, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, por ceder o espaço do laboratório para as extrações de DNA.

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

À FUNDECT e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas de turma, pela convivência, em especial a Débi, Lu, Jô e Paula, por tornarem meus dias mais leves e agradáveis na capital.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pelos ensinamentos, palavras de apoio e encorajamento.

Em especial a minha família, pais Ana e Damião, irmãos Andressa e Diego, companheiro Patrick, pelo amor, paciência, confiança e apoio em tudo que me disponho a fazer, sem vocês esse trabalho não existiria!

À todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Resumo

Bromeliaceae apresenta espécies epífitas, saxícolas ou terrestres, que se distribuem do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, na Argentina, compreendendo 58 gêneros e 3140 espécies. O gênero *Dyckia* apresenta aproximadamente 160 espécies, sendo muitas destas raras e endêmicas. Este gênero é caracterizado pela ausência de “tanque” que acumula água, possibilitando a essas espécies habitar ambientes com condições de seca extrema, como a região central do Brasil. *Dyckia leptostachya* é uma bromélia terrícola e perene, as folhas emergem de um rizoma curto, com espinhos marginais, possui inflorescência simples com flores laranja-avermelhadas. Esta espécie ocorre na Bolívia, Paraguai, Argentina e no Brasil, sendo encontrada desde o estado do Tocantins até o Rio Grande do Sul. No Mato Grosso do Sul, *D. leptostachya* é encontrada em bancadas lateríticas na área do Planalto Residual do Urucum, Corumbá. As características ambientais desta região impõem às plantas severas condições de suprimento de água devido à pequena profundidade do substrato que, por sua vez, condiciona temperaturas elevadas e rápida evaporação. O objetivo geral deste estudo foi contribuir com informações acerca da diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Dyckia leptostachya*. Para isso, foi amostrado um total de 150 indivíduos de cinco populações naturais de bancadas lateríticas, distantes cerca de 10 km uma da outra no Planalto Residual do Urucum. Para descrever a diversidade genética nós testamos dezenove marcadores de microssatélites nucleares descritos para outras espécies de Bromeliaceae. Seis marcadores apresentaram amplificação satisfatória e padrão polimórfico e foram utilizados para inferir a diversidade e estrutura genética de *D. leptostachya*. Os resultados de diversidade genética revelaram estimativas de heterozigosidade semelhantes aos encontrados para outras espécies de bromélias. Estes altos índices de diversidade genética foram observados nas cinco populações de *D.*

leptostachya ($H_O = 0,442$ a $H_O = 0,665$). As populações de *D. leptostachya* apresentaram uma estruturação genética baixa ($F_{ST} = 0,073$), com maior proporção da variação genética devido a diferenças dentro das populações (91,62%), e a menor entre populações (8,37%), e demonstraram alto fluxo gênico entre as cinco populações ($Nem = 1,87-6,83$). A análise bayesiana revelou a presença de apenas dois grupos genéticos ($K=2$). As populações apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) médio de 0,390. *Dyckia leptostachya* é auto-incompatível e possui reprodução vegetativa, a combinação desses dois fatores poderia estar contribuindo, a curto e longo prazo, respectivamente, com os altos índices de diversidade genética e fluxo gênico observados. A alta diversidade genética observada em *D. leptostachya* é importante para a sobrevivência e manutenção das populações naturais da espécie em longo prazo, porém ainda são necessárias estratégias de conservação nas populações que ocorrem em fazendas particulares para evitar o aumento da diferenciação genética e conservar os altos índices de diversidade genética encontrados.

Palavras-chave: Bancada laterítica, Bromeliaceae, fluxo gênico, genética de populações, microssatélites.

Abstract

Bromeliaceae presents epiphytic, saxicolous or terrestrial species, is distributed from the southern of American United States to Patagonia, in Argentina, comprising 58 genera with about 3140 species. Genus *Dyckia* has about 160 species, many of which are rare and endemic. This genus is characterized by the absence of a "tank" that accumulates water, enabling these species to inhabit environments with extreme drought conditions, such as the central region of Brazil. *Dyckia leptostachya* is a terrestrial and perennial bromeliad, the leaves emerge from a short rhizome, with marginal spines, it has a simple inflorescence with orange-reddish flowers. This species occurs in Bolivia, Paraguay, Argentina and Brazil, where it can be found from Tocantins to Rio Grande do Sul States. In Mato Grosso do Sul, *D. leptostachya* is found in ironstone outcrops (lateritic benches) in the Urucum Residual Plateau, in Corumbá city. The environmental characteristics of this region imposes to the plants severe conditions of water supply due to the narrow depth of the substrate, which in turn, determines high temperatures and rapid water evaporation. The general objective of this study was to contribute with information regarding the diversity and genetic structure of natural populations of *Dyckia leptostachya*. For this, 150 individuals from five natural populations of lateritic stands were sampled, distant about 10 km from each other in the Urucum Residual Plateau. To describe the genetic diversity we have tested nineteen nuclear microsatellite markers described for other species of Bromeliaceae. Six markers showed satisfactory amplification and polymorphic pattern and were used to infer the diversity and genetic structure of *D. leptostachya*. The results of genetic diversity revealed heterozygosity estimates similar to those found for other species of bromeliads. These high rates of genetic diversity were observed in the five populations of *D. leptostachya*, ranging from $H_O = 0.442$ to $H_O = 0.665$. The populations of *D. leptostachya* presented a low genetic

structure ($F_{ST} = 0.073$), with a higher proportion of genetic variation due to differences within populations (91.62%), and the lowest among populations (8.37%), and showed high gene flow among the five populations ($Nem = 1.87-6.83$). Bayesian analysis revealed the presence of only two genetic groups ($K = 2$). Populations showed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium, with the inbreeding coefficient (F_{IS}) of 0.390. *Dyckia leptostachya* is self-incompatible and presents clonal reproduction. The combination of these two factors could be contributing, in the short and long term, respectively, with the high rates of genetic diversity and gene flow observed. The high genetic diversity observed in *D. leptostachya* is important for the survival and maintenance of the natural populations of the species in long term, but conservation strategies are still necessary in the populations that occur on private farms to avoid the increasing in genetic differentiation and to preserve the high indices of genetic diversity.

Keywords: Ironstone outcrops, Bromeliaceae, gene flow, population genetics, microsatellites.

Sumário

Sumário

1. Introdução geral	11
1.1. Afloramentos rochosos ferruginosos: “Bancadas lateríticas”	11
1.2. A família Bromeliaceae	13
1.3. O gênero <i>Dyckia</i> Schult. & Schult.f. e <i>Dyckia leptostachya</i> Baker	16
1.4. Conservação, diversidade e estrutura genética em populações naturais	18
1.5. Marcadores moleculares de Microssatélites	20
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. Referências Bibliográficas	24
4. Artigo	33
5. Considerações finais	70
6. Anexos	72

1. Introdução geral

1.1. Afloramentos rochosos ferruginosos: “Bancadas lateríticas”

Distribuídos por todo o globo, os afloramentos rochosos concentram-se em topos de morros e outras elevações. A vegetação que porventura se instala nestes ambientes encontra condições bastante severas, como os altos níveis de insolação, grande amplitude térmica, ausência de solo e escassez de água, além da ação deletéria de ventos e enxurradas (Takahasi 2010).

Esta comunidade vegetal não recebe uma denominação específica, sendo tratada, muitas vezes, como “vegetação sobre afloramentos rochosos”, em face à variedade de domínios florísticos na qual se encontra inserida (Takahasi 2010). Entretanto, Rizzini (1997), ao tratar dos tipos de vegetação que ocorrem no Brasil, situou as plantas que se estabelecem em topos de morro no tipo campos limpos, enfatizando sua ampla distribuição, desde as chapadas areníticas e quartzíticas no Centro-Oeste brasileiro, sobretudo em Goiás e Minas Gerais, até as serras dos estados sulinos, onde o clima é mais frio e sem estação seca.

Como os estudos nestas comunidades ainda são recentes há uma profusão de termos e nomes utilizados para definir ou caracterizar esta vegetação, como por exemplo: campo rupestre (Grandi et al. 1988; Brandão 1992) campo rupestre ferruginoso (Vincent e Meguro 2008), canga hematítica (Silva 1991; Mourão e Stehmann 2007; Viana e Lombardi 2007; Jacobi et al. 2007), além de vegetação xerofítica de savanas metalófilas (Rayol 2006).

No Brasil, as cangas ocorrem principalmente no Planalto Central e no Nordeste, enquanto na região amazônica sua distribuição se dá de forma mais ampla (Bigarella et al. 2007). As maiores reservas de minério de ferro do país encontram-se em bancadas

lateríticas, como no Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais-MG), Serra de Carajás (Pará-PA), Caetité (Bahia-BA) e Morraria do Urucum (Mato Grosso do Sul-MS) (Carmo et al. 2012), mas a exploração econômica sem o devido planejamento ambiental tem sido a principal ameaça à flora destes habitats (Jacobi et al. 2007).

Na vegetação sobre campos ferruginosos de Corumbá e Ladário poucos trabalhos botânicos (Silva 2006; Silva e Tozzi 2008) foram realizados até o momento, sendo que o presente estudo é um dos pioneiros a trabalhar com diversidade e estrutura genética de Bromeliaceae que ocorrem nos afloramentos rochosos ferruginosos de Corumbá, também denominados “bancadas lateríticas” (Takahasi 2010).

As bancadas lateríticas das Morrarias do Urucum e do Rabicho, em Corumbá, MS, localizam-se nas áreas de drenagem (em torno de 100m de altitude) no sopé destes morros, possuem pequena declividade e são formadas por material laterítico endurecido de natureza ferrífera (Cardoso et al. 2000), com pouca aptidão para uso agrícola ou pastoris (Pott et al. 2000).

Estudos anteriores com a família Bromeliaceae na área do Maciço do Urucum (Corumbá, Mato Grosso do Sul - MS) identificaram a ocorrência de duas espécies de *Dyckia*, sendo elas: *D. leptostachya* Baker e *D. excelsa* Leme (Paggi et al. 2014; Versieux et al. in press). Estas espécies ocorrem sobre as “bancadas lateríticas”, constituindo as chamadas ilhas de solo ou ilhas de vegetação (Fig. 1; Meirelles 1999; Takahasi 2010). Os agrupamentos das plantas na forma de ilhas de solo propiciam o aumento do volume do substrato e redução da exposição do solo permitindo um tempo maior de conservação de água, amenizando as severas condições ambientais (Meirelles 1999; Conceição et al. 2007). A restrição ambiental limita o número de espécies estabelecidas nestes locais e pode contribuir para o isolamento reprodutivo destas

populações conferindo também um elevado grau de endemismo a estes ambientes (Porembski et al. 1998).

Devido à marcante presença da família Bromeliaceae na Mata Atlântica, poucos trabalhos com esta família são conduzidos em outros ecossistemas. Os Campos Rupestres, no entanto, têm apresentado grande diversidade e alta taxa de endemismo para esta família (Wanderley e Martinelli 1987). A vegetação dos Campos Rupestres apresenta certa uniformidade, escondendo uma das floras mais ricas do Brasil, principalmente em espécies de bromélias (Leme e Marigo 1993). Assim, a crescente destruição dos diversos ecossistemas poderá conduzir à extinção de espécies ainda pouco estudadas.

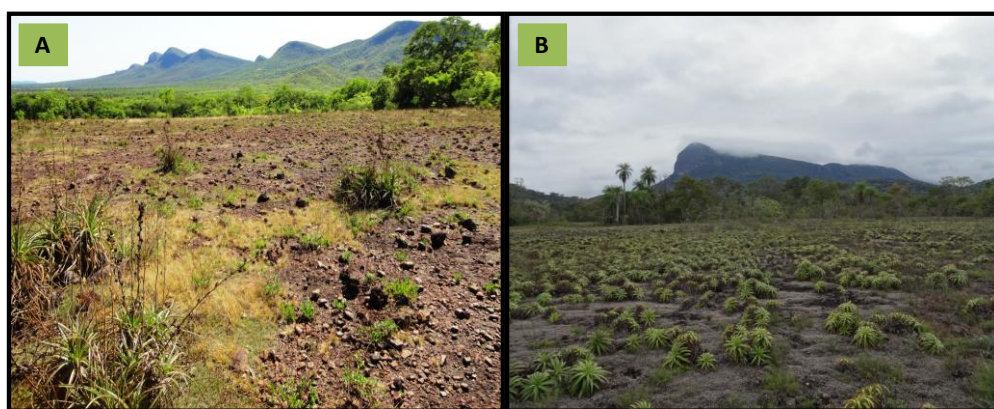


Figura 1. Bancadas lateríticas no sopé da Morraria do Urucum em Corumbá-MS, Brasil. (A) Ilhas de solo de *Dyckia excelsa* na fazenda São João e (B) Ilhas de solo de *Deuterocohnia meziana* no Parque Natural Municipal de Piraputangas.

1.2. A família Bromeliaceae

Bromeliaceae Juss. possui aproximadamente 3000 espécies distribuídas em 58 gêneros e oito subfamílias: Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnoideae, Navioideae, Hechtioideae, Tillandsioideae, Lindmanioideae e Brocchinioideae (Givnish et al. 2011). A diferenciação entre as subfamílias está baseada em características morfológicas, tais como tipo de frutos e sementes, margem das folhas e posição do

ovário (Smith e Downs 1974; Luther 2012). Aproximadamente 73% dos gêneros e 40% das espécies de bromélias podem ser encontrados no Brasil (Leme e Marigo 1993), principalmente na Floresta Atlântica (Reitz 1983), tornando o país o mais importante centro de diversidade desse grupo (Leme e Marigo 1993).

A família é conhecida por sua radiação adaptativa recente, com hábitos diferentes, cujas espécies podem ser encontradas a partir do nível do mar a altitudes acima de 4000 m, no deserto e em regiões úmidas, assim como em solos sujeitos a inundações regulares e em locais com baixa ou alta luminosidade (Benzing 2000). As espécies podem prosperar em areias e rochas escaldantes, e resistir a temperaturas próximas de 0°C (Benzing 2000). É uma família essencialmente neotropical com exceção de uma única espécie, *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Midbr., que ocorre no oeste do continente africano (Smith e Downs 1974; Moreira et al. 2006), o que parece ter sido um evento de recente dispersão a longa distância (Givnish et al. 2004).

Esta família é constituída por plantas terrestres, rupícolas e epífitas, herbáceas, variando de plantas delicadas e de pequeno porte, como *Tillandsia recurvata* (L.) L., com poucos centímetros de comprimento, até plantas de grande porte, como *Puya raimondii* Harms, encontrada nos Andes, que chega a atingir mais de 10 metros de altura (Smith e Downs 1974; Reitz 1983; Moreira et al. 2006). As bromélias apresentam grande variabilidade de formas, sendo em geral plantas bem características e ornamentais. Segundo Rizzini (1997) e Benzing (2000), os diferentes habitats e, especialmente, a natureza do substrato influenciam no aspecto da planta, que pode variar amplamente em tamanho e coloração das folhas, assim como na morfologia das flores.

Em diversos ambientes as bromélias atuam como um subsistema ecológico contribuindo na estabilidade dos ecossistemas (Benzing 2000). Esses vegetais são

conhecidos como fitotelmata, pois abrigam em suas cisternas desde algas unicelulares, algas filamentosas, protistas, invertebrados e vertebrados, constituindo um micro habitat importante para esses organismos (Matos 2000). Outros animais, por exemplo, aves, crustáceos, formigas e abelhas, utilizam essas plantas como local para nidificação, abrigo ou alimentação (Sazima et al. 1996; Sazima et al. 2000; Lenzi et al. 2006). Atualmente, mais de 90 espécies de bromélias são utilizadas no mundo como fonte de fibras, forragem, medicinais, rituais místicos, alimentação humana, entre outros (Bennet et al. 2001). Entretanto, há uma carência de bromélias cultivadas, favorecendo o extrativismo ilegal e dessa maneira causando uma redução no número de indivíduos, levando a perda da diversidade genética nas suas populações (Coffani-Nunes 2002).

Apesar de serem plantas quase exclusivamente herbáceas, é notável sua diversidade ecológica, visto que as espécies são encontradas em diferentes tipos de substratos, bem como nos mais variados habitats (Benzing 2000; Fischer e Araújo 1995), constituindo um sistema de estudo favorável às abordagens ecológicas e evolutivas. Em Bromeliaceae é comum ocorrer a combinação entre dois modos de reprodução: via produção de sementes, normalmente envolvendo a fusão de gametas, e via propagação clonal (Benzing 2000).

Poucos trabalhos foram realizados para avaliar a variabilidade genética de populações de bromélias, no entanto as populações naturais estão sendo reduzidas pela ação antrópica destrutiva de seu habitat. Pesquisas realizadas recentemente consideram análises da diversidade e estrutura genética das populações, as quais são importantes para a emissão de um diagnóstico da real viabilidade das populações, para que sejam tomadas decisões visando sua conservação (Zanella et al. 2012).

1.3. O gênero *Dyckia* Schult. & Schult.f. e *Dyckia leptostachya* Baker

Dyckia Schult. & Schult. f. é composto por aproximadamente 160 espécies, e juntamente com os gêneros *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (ca. 27 espécies), *Deuterocohnia* Mez (ca. 17 espécies), *Fosterella* L.B Smith (ca. 31 espécies) e *Pitcairnia* L'Hér (ca. 400 espécies) pertencem à subfamília Pitcairnioideae (Krapp et al. 2014).

Espécies de *Dyckia* são usualmente terrestres, xerofíticas, crescendo em solos bem drenados, ou podem ser rupícolas, sendo encontradas em diversos afloramentos rochosos, em ambientes secos e algumas vezes úmidos ou até mesmo espécies reófitas (Smith e Downs 1974; Benzing 2000). São plantas caracterizadas por formar rosetas com folhas coriáceas ou suculentas, com espinhos marginais bem desenvolvidos (Fig. 2), sem a formação do tanque que acumula água, caráter típico de Bromeliaceae (Crayn et al. 2004).

Apresentam inflorescência racemosa com escapo lateral, simples ou ramificado. As flores podem ser sésseis ou pediceladas, e as cores das pétalas, sépalas e inflorescência variam entre vermelho, laranja e amarelo (Smith e Downs 1974; Krapp et al. 2014). As plantas propagam-se vegetativamente por meio de rizomas subterrâneos curtos ou longos (Smith e Downs 1974). As sementes são normalmente dispersas pelo vento, ou pela água no caso de algumas espécies adaptadas a ambientes periodicamente inundados, como a reófito, *D. brevifolia* Baker (Leme et al. 2012). Este gênero tem como polinizadores principais os beija-flores, mas insetos, como abelhas e borboletas, também já foram relatados (Rogalski et al. 2009; Vosgueritchian e Buzato 2006).

Espécies de *Dyckia* podem ser encontradas na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil são encontradas 83% das espécies conhecidas, com distribuição

que vai do nível do mar até 1000 m de altitude (Leme et al. 2012), em ambientes expostos ao sol nos domínios Mata Atlântica, Caatinga, Campos Rupestres, Restinga, Amazônia e Cerrado (<http://www.splink.org.br>). O centro de diversidade de *Dyckia* ocorre nas regiões montanhosas do Brasil central, delimitado pela Mata Atlântica e Caatinga no leste e pelo Chaco no Oeste (Krapp et al. 2014).

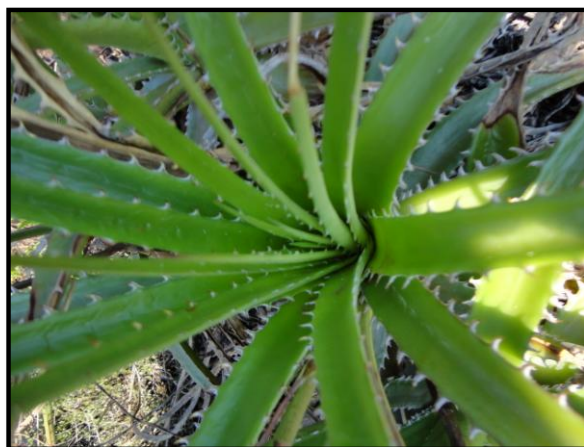


Figura 2. Detalhe da base foliar em formato de roseta com folhas suculentas e espinhos marginais bem desenvolvidos, característico do gênero *Dyckia*.

Dyckia leptostachya Baker é terrícola, as folhas emergem de um rizoma curto, largo e reto, apresenta espinhos marginais castanhos espaçados, inflorescência multiflora simples, escapo coberto de levíssima lanugem, cilíndrico e tortuoso, sendo as flores laranja-avermelhadas (Fig.3; Reitz 1983). Possui ampla distribuição, no Brasil ocorre desde o estado do Tocantins até o Rio Grande do Sul (<http://www.splink.org.br/>), além dos países Bolívia, Paraguai e Argentina (Reitz 1983). No Mato Grosso do Sul, *D. leptostachya* é encontrada em regiões de bancadas lateríticas na área do Planalto Residual do Urucum, conhecido também como Maciço do Urucum (19°03'45" S e 57°41'15"O), localizado ao sul das áreas urbanas das cidades de Corumbá e Ladário.



Figura 3.(A) Indivíduo adulto de *Dyckia leptostachya*;(B) Detalhe do escapo floral com lanugem e flores de coloração vermelho-alaranjadas; (C) Detalhe do escapo floral saindo do meristema lateral da base foliar da planta (Fotos: GM Paggi)

1.4. Conservação, diversidade e estrutura genética em populações naturais

A genética da conservação é o uso da teoria e técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas. Seu objetivo é preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais, através da elucidação de aspectos da biologia das espécies, relevantes para seu manejo e conservação, como, por exemplo, avaliar a existência de fluxo gênico entre populações e determinar se elas diferem suficientemente, do ponto de vista genético, para justificar um manejo separado. Essas informações contribuem para o estabelecimento de estratégias de conservação, visando maximizar a retenção da diversidade genética e minimizar o endocruzamento (Barbieri 2003; Frankham et al.2003).

A diversidade genética de uma espécie ou de uma população deve-se aos efeitos combinados de sua história genealógica e processos evolutivos (Comes e Kadereit 1998), sendo uma condição fundamental para que ocorra evolução. A seleção natural

atua entre as variantes dentro das populações em relação à adaptação ao ambiente, proporcionando variabilidade entre populações e, por fim, variabilidade entre espécies (Torggler et al. 1995).

Caracterizar a diversidade genética dentro das populações é de importância primária para estudos evolutivos, de conservação, melhoramento e manejo de plantas. A estrutura genética das populações reflete a interação entre diferentes processos, incluindo a sua história evolutiva (distribuição, fragmentação de habitat, isolamento da população), mutações, deriva genética, sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção (Sales et al. 2001), os quais podem ajudar a compreender os processos de adaptação a circunstâncias ecológicas particulares (Parker et al. 1998).

A genética de populações tornou-se ferramenta importante por possibilitar a descrição da variabilidade genética em populações, bem como o estudo dos mecanismos de manutenção desta variabilidade (Nei 1987). Incrementos nos níveis de diversidade genética ocorrem por meio de mutações. Entretanto, geralmente, estas ocorrem a taxas muito baixas e, por isso, sua importância na genética de populações restringe-se a uma perspectiva de longo prazo, cerca de centenas a milhares de gerações (Allendorf e Luikart 2007). Perdas de diversidade ocorrem com frequência muito maior e por um grande número de fatores, como, por exemplo, deriva genética, endogamia, seleção natural, e reduções do tamanho populacional.

Fatores relacionados à ação antrópica frequentemente reduzem as populações a tamanhos nos quais as espécies ficam suscetíveis a efeitos acidentais ou estocásticos. Por isso, a investigação desses aspectos em populações naturais é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo, especialmente para espécies raras, em perigo de extinção, com poucas e/ou pequenas

populações e com sistemas reprodutivos que dificultam o manejo (Frankham et al. 2008; Gitzendanner et al. 2012).

A diversidade genética em populações naturais pode ser caracterizada por meio de marcadores moleculares. Estes fornecem índices de diversidade, como a heterozigosidade esperada (H_E), o número médio de alelos observados (A), o número efetivo de alelos (A_e) e a porcentagem de locos polimórficos. Estimativas de diversidade genética são também bastante úteis para a otimização de estratégias de amostragem (Hamrick e Godt 1996).

Estudos de diversidade e estrutura genética utilizando a amplificação heteróloga de marcadores moleculares de microssatélites em outras espécies foram realizados com sucesso (Barbará et al. 2007a, 2009; Palma-Silva et al 2009; Cascante-Marín 2005; Paggi et al. 2015).

Por fim, o conhecimento da diversidade genética é fundamental em programas de conservação, sendo a sua preservação extremamente importante para a manutenção do potencial evolutivo e necessária para as populações se adaptarem as alterações no ambiente (Frankham et al. 2003).

1.5. Marcadores moleculares de Microssatélites

Microssatélites ou SSR (“Sequências Simples Repetidas”) são sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas lado a lado, as quais representam regiões instáveis do genoma que sofrem mutações a taxas mais elevadas do que as observadas nas sequências de cópia única (Pinto et al. 2001). A instabilidade dos microssatélites resulta em marcadores altamente polimórficos, multialélicos, que são extremamente úteis em estudos de genética de populações (Pinto et al. 2001).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites são marcadores codominantes, e espécie-específicos. Deste modo, estes marcadores podem ser utilizados para ajudar a resolver problemas que variam desde a taxonomia, questões relacionadas à paternidade, à estrutura genética de populações, sistema de cruzamento, especialização ecológica e capacidade de colonização de populações (Parker et al. 1998; Boneh et al. 2003; Faleiro 2007).

Como os *loci* de microssatélites são espécie-específicos, é necessário isolá-los para cada espécie. Porém, a presença de regiões flanqueadoras conservadas permite a amplificação desses *loci* em espécies próximas. O alto grau de polimorfismo observado na espécie em que os locos foram descritos pode ocasionalmente não ser observado em espécies relacionadas, especialmente quando aumenta a distância evolutiva entre as mesmas (Rubinsztein et al. 1995; Barbará et al. 2007b). No caso da família Bromeliaceae, para a qual existem relatos de ampla radiação adaptativa acarretando em baixos níveis de divergência nas sequências de DNA, os marcadores são transferíveis entre espécies da mesma subfamília e até entre as subfamílias (Barbará et al. 2007a, 2009; Palma-Silva et al. 2007; Paggi et al. 2008; Wöhrmann e Weising 2011; Wöhrmann et al. 2012; Zanella et al. 2012; Goetze et al. 2013; Neri et al. 2015; Wöhrmann et al. 2016).

Os marcadores genético-moleculares permitem gerar grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos de determinado germoplasma. Tais informações são muito úteis nas diferentes estratégias de conservação dos recursos genéticos como a *ex situ*, com a introdução de germoplasma em banco de sementes, ou *in situ*, com a implantação de áreas de proteção. Em cada estratégia, os marcadores moleculares podem auxiliar nas diferentes etapas, como a coleta,

manutenção, caracterização, manejo, ampliação e uso dos recursos genéticos (Faleiro 2007).

Informações sobre a variabilidade genética dentro e entre populações, assim como o conhecimento do germoplasma existente de uma determinada espécie, são importantes, pois podem servir como base para a utilização e conservação dos recursos genéticos disponíveis (Handa 1998). Além disso, a caracterização de germoplasma tem papel fundamental para o futuro melhoramento das espécies (Zanella 2009).

A amplificação heteróloga de *loci* de microssatélites é uma ótima ferramenta para a pesquisa em populações naturais de espécies de bromélias nativas, podendo ser usada em diferentes áreas do conhecimento como: genética populacional (diversidade genética e estrutural) e o fluxo gênico, os quais são dados importantes para produzir um diagnóstico de viabilidade de populações e sua conservação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Devido à escassez de conhecimentos sobre aspectos genéticos e biológicos da flora de bancadas lateríticas e da família Bromeliaceae, tais como o estudo da estrutura genética, isolamento por distância e fluxo gênico, o presente trabalho tem como objetivo geral contribuir com informações acerca da diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Dyckia leptostachya*, as quais são importantes para o estabelecimento de estratégias de manejo e conservação da espécie.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar populações naturais nas regiões de bancadas lateríticas no Maciço do Urucum-MS;
- Descrever a variabilidade genética e estimar a estrutura genética dentro e entre populações de *Dyckia leptostachya*;
- Avaliar o fluxo gênico entre populações isoladas nas diferentes bancadas lateríticas;

3. Referências Bibliográficas

- Allendorf FW, Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Oxford: Blackwell 642
- 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 *A. geniculata*. *Mol Ecol* 16:1981–1992
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2009) Genetic relationship 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-London* 103:65-77
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007b) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16:3759–3767
- Barbieri RL (2003) Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: Freitas LB e Bered F (org.) *Genética e Evolução Vegetal*. Ed da UFRGS Porto Alegre p.403-414
- Bennett BC, Baker MA, Gomez P (2001) Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador. *Adv Econom Bot* 14:1-299
- Benzing DH (2000) *Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press Cambridge p.689
- Bigarella JJ, Becker RD, Santos GF(2007)*Estrutura e origem das paisagens tropicais e subtropicais* 2nd Ed Florianópolis: Ed da UFSC

- Boneh L, Kuperus P, Van Tenderem PH (2003) Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculate* and *Guzmania monostachya*. Mol Ecol Notes 3: 302-303
- Brandão M(1992) Caracterização geomorfológica, climática, florística e faunística da Serra do Curral em Belo Horizonte, MG. Daphne 2:13-38
- Cardoso EL, Oliveira H, Amaral JAM, Ker JC, Pereira NR, Santos RD, Tôsto SG, Spera ST, Carvalho Jr W (2000) Pedologia In: Zoneamento ambiental da Borda Oeste do Pantanal: maciço do Urucum e adjacências (JSV Silva, org.). Brasília, DF, Comunicação para transferência de tecnologia, p. 95-109
- Carmo FF, Campos IC, Jacobi CM(2012) Cangas: ilhas de ferro estratégicas para a conservação. Ciência Hoje 295:48-50
- Cascante-Mar AJGB, Oostermeijer JHD, Wolf JCM, Den N (2005) Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a premontane tropical forest. Plant Biology 7:203-209
- Coffani-Nunes JV(2002) Bromélias. In: Simões LL e Lino CF (org.) Sustentável Mata Atlântica – A exploração de recursos vegetais. Editora Senac, São Paulo, pp.119.
- Comes HP, Kadereit JW (1998). The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. Trends Plant Sci 3:432–438
- Conceição AA, Giulietti AM, Meirelles ST(2007) Ilhas de vegetação em afloramentos de quartzito-arenito no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Acta Bot Brasil 21:335-347
- Crayn DM, Winter K, Smith JAC(2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. PNAS 101:3703-3708
- Faleiro FG (2007) Marcadores Genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Embrapa Planaltina DF

- Fisher EA, Araújo AC(1995) Spatial organization of a bromeliad community in the Atlantic rainforest, south eastern Brazil. *J Trop Ecol* 11:559-567
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2003) *Introduction to Conservation Genetics*. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) *Fundamentos de Genética da Conservação*. Editora SBG, Ribeirão Preto, SP
- Gitzendanner MA, Weekley CW, Germain-Aubrey CC, Soltis DE, Soltis OS (2012) Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. *Conserv Genet* 13:223–234
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, 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, Sytsma KJ (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 5:98-872
- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE, 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 data. *Int J Plant Sci* 165:35-S54
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochem Syst Ecol* 48:194-198

- Grandi TSM, Siqueira JC, Paula JA(1988) Levantamento florístico da flora fanerogâmica dos campos rupestres da Serra da Piedade, Caeté, Minas Gerais. *Pesquisa Botânica* 39:89-104
- Handa T(1998) Utilization of molecular markers for ornamental plants. *J Japan Soc Hort Sci* 67: 1197-1199
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Conservation genetics of endemic plant species. In: *Avice JC Hamrick JL Ed Conservation genetics: case histories from nature. Chapman e Hall*, pp.281–304
- Jacobi CM, Carmo FF, Vincent RC, Stehmann JR(2007) Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodivers Conserv* 16:2185-2200
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, Weising K (2014) Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Syst Evol* 300:1591-1614, DOI 10.1007/s00606-014-0985-0
- Leme EMC, Marigo LC (1993) Bromélias na natureza. Marigo, Comunicação Visual Ltda Rio de Janeiro, pp. 183
- Leme EMC, Ribeiro OBC, Miranda ZJG (2012) New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. *Phytotaxa* 67:9-37
- Lenzi M, Matos JZ, Orth AI(2006) Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta bot. bras* 20:487-500
- Luther HE(2012) An alphabetical list of bromeliad binomials. 11^{ed}. The Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad society International
- Matos JZ(2000) Ecologia de bromélias com ênfase em *Vriesea incurvata* Gaud. (Bromeliaceae), em áreas com vegetação primária e secundária da floresta tropical

atlântica, no sul do Brasil. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina
Florianópolis

Meirelles ST (1999) Estrutura da comunidade e características funcionais dos
componentes da vegetação de um afloramento rochoso em Atibaia, SP. Tese, São
Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar

Moreira BA, Wanderley MGL, Barros MAC(2006) Bromélias: importância ecológica
e diversidade. Taxonomia e morfologia, Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Curso de Capacitação de monitores e
educadores do Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo

Mourão A, Stehmann JR(2007) Levantamento da flora do campo rupestre sobre canga
hematítica couraçada remanescente na Mina do Brucutu, Barão de Cocais, Minas
Gerais, Brasil. Rodriguésia 58:775-786

Nei M(1987) Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University. p.
512

Neri J, Nazareno AG, Wendt T, Palma-Silva C (2015) Development and
characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and
cross-amplification in other species of Bromeliaceae. Biochem Syst Ecol 58: 34-
37.

Paggi GM, Louzada RB, Ishii IH, Takahasi A, Arruda RCO, Lorenz-Lemke AP (2014)
Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil:
taxonomy, geographic distribution and notes on leaf anatomy. Syst Bot 40:129-
135.

Paggi GM, Palma-Silva C, Bodanese-Zanettini MH, Lexer C, Bered F(2015) Limited
pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic
forest bromeliad. Flora 211:1–10

- Paggi GM, Palma-Silva C, Cidade FW, Souza ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C, Bered F (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Research* 8:980-982
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Mol Ecol Notes*, 7:654-657
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Mol Ecol* 7:361-382
- Pinto LR, Vieira MLC, Souza AP, Júnior CLS (2001) Isoenzimas e microssatélites em plantas. *Biotecnologia e Desenvolvimento*
- Porembski S, Martinelli R, Ohlemuller R, Barthlott W (1998) Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Divers Distrib* 4:107–119
- Pott A, Silva JSV, Salis SM, Pott VJ, Silva MP (2000) Vegetação e uso da terra. In: JSV Silva (ed) *Zoneamento ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências*, Embrapa, Brasília, pp 111-131
- Rayol BP (2006) Análise florística e estrutural da vegetação xerofítica das savanas metalófilas na Floresta Nacional de Carajás: subsídios à conservação. Dissertação, Universidade Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará.
- Reitz R (1983) Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. In: Reitz R. *Flora Ilustrada Catarinense (Fasc Brom)* Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, SC, pp 559.

- Rizzini CT (1997) Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. (ed 2) Âmbito Cultural Edições Ltda, Rio de Janeiro, pp. 747.
- Rogalski JM, Reis A, Reis MS, Hmeljevski KV(2009) Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. Rev BrasBot 32:691-702
- Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li SH, Margolis RL, Ross AC, Ferguson-Smith MA(1995) Microsatellites evolution – evidence for directionality and variation in rate between species. Nat Genet 10:337-343
- Sales E, Nebauer SG, Mus, M, Segura, J(2001) Population genetic study in the balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. Am J Bot 88:1750-1759
- Sazima I, Buzato S, Sazima M (1996)An assemblage of hummingbird – pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil.Plant Biology 109:p.149-160.
- Sazima M, Buzato S, Sazima I(2000)Polinização por beija-flores em *Nidularium* e gêneros relacionados. In: Leme EMC. *Nidularium*: Bromélias da Mata Atlântica. Sextante Artes, Rio de Janeiro, pp.190-195
- Silva MFF(1991) Análise florística da vegetação que cresce sobre canga hematítica em Carajás - Pará (Brasil). Bol Mus Para Emílio Goeldi, Bot 7(1):79-107
- Silva RR (2006) Leguminosae no Planalto Residual do Urucum, oeste do Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil: inventário, taxonomia e similaridade florística. Tese, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo
- Silva RR, Tozzi AMGA (2008) A new species of *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. Brittonia 60:34-37

- Smith LB, Downs RJ(1974) Bromeliaceae (Pitcarnioideae). Fl Neotrop Monogr 14:1-662
- Takahasi A (2010) Ecologia da vegetação em bancadas lateríticas em Corumbá, MS. Tese, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Torggler MGF, Contel EPB, Torggler SP (1995) Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, pp. 186
- Versieux LM, Coffani-Nunes JV, Paggi GM, Costa AF. Check list of Bromeliaceae from Mato Grosso do Sul, Brazil. Iheringia, Sér Bot *in press*
- Viana PL, Lombardi JA(2007) Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. Rodriguésia 58:159-177
- Vincent RC, Meguro M (2008) Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. Rev Bras Bot 31: 377-388
- Vosgueritchian SB, Buzato S (2006) Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Ptilacnoideae) e interação planta-animal. Rev Bras Bot 29: 433-442
- Wanderley MGL, Martinelli G (1987) Bromeliaceae. In Giulietti AM, Menezes NL, Pirani JR, Meguro M, Wanderley MGL. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista das espécies. Bol Bot Univ, São Paulo 9:1–151
- WöhrmannT, HuettelB, WagnerN, WeisingK (2016) Microsatellites from *Fosterella christophii* (Bromeliaceae) by de novo transcriptome sequencing onthe Pacific Biosciences RS platform. Appl Plant Sci4:1500084doi:10.3732/apps.1500084
- Wöhrmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K(2012) Development of 15 nuclear microsatellites markers in the genus *Dyckia*

- (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 5: 81-84. doi 10.1007/s12686-012-9738-y
- Wörhmann T, Weising K(2011) In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor Appl Genet* 123: 635-647.
- Zanella CM (2009) Caracterização genética, morfológica e fitoquímica de populações de *Bromelia antiacantha* (Bertol.) do Rio Grande do Sul. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Katchuck-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F(2012) Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genet Mol Biol* 35:1020-1026.

4. Artigo

Estrutura genética populacional da bromélia de afloramento rochoso, *Dyckia leptostachya*: fluxo gênico alto entre populações e implicações conservacionistas

Artigo a ser submetido para Brazilian Journal of Botany

Estrutura genética populacional da bromélia de afluoramento rochoso, *Dyckia leptostachya*: fluxo gênico alto entre populações e implicações conservacionistas

BRENDA BAÍA BRANDÃO^{1,2}, LUCIANA VICENTE DA SILVA^{2,3}, FERNANDA MARIA DE RUSSO GODOY^{2,4}, GISLAINE MOREIRA DE MIRANDA^{1,2}, e GECELE MATOS PAGGI^{1,2,4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

²Laboratório de Genética, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* do Pantanal - UFMS/CPAN, CEP 79304-902, Corumbá, MS, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Instituto de Biociências, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Rede pró-Centro-Oeste, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

Short running title: Genetic diversity of *Dyckia leptostachya*

*Author for correspondence: gecelepaggi@gmail.com. Telephone: +55 (67) 3234-

6849

Resumo

Os estudos que envolvem a diversidade genética de plantas são fundamentais no estabelecimento de estratégias de conservação, pois podem estimar o potencial adaptativo das populações. O presente estudo descreveu os padrões de estrutura e diversidade genética populacional e fluxo gênico para *Dyckia leptostachya*, que ocorre em bancadas laterítica do Mato Grosso do Sul, Brasil. Para as análises genéticas foram utilizados seis locos heterólogos de microssatélites nucleares. As cinco populações de *D. leptostachya* apresentaram altos índices de diversidade genética ($H_O = 0,530$ e $H_E = 0,862$), estruturação genética moderada ($F_{ST} = 0,073$), assim como número de migrantes efetivos variando de 1,877 a 6,835 indivíduos por geração. As populações apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com coeficiente de endocruzamento médio de 0,390. A maior riqueza alélica foi de 8,35 alelos para a população do Parque Natural Municipal de Piraputangas I. Foi observada grande variação genética (96,64%) dentro das populações. Baixos a moderados níveis de diferenciação genética entre populações foram encontrados com comparações de F_{ST} par a par, variando de 0,034 a 0,101. Análises bayesianas revelaram que *D. leptostachya* é composta por apenas dois grupos genéticos. O número de migrantes por geração foi alto (> 1), o que mantém a coesão das populações com alto fluxo gênico. A alogamia associada à reprodução vegetativa pode ser responsável pelos altos níveis de diversidade genética encontrados para a espécie. Nossos resultados demonstram a importância de unidades de conservação para a preservação de espécies, bem como, que diferentes populações são necessárias para a manutenção de uma espécie como uma unidade evolutiva.

Palavras-chave: Brasil Central, Bromeliaceae, Diversidade genética, microssatélites, Pantanal, Pitcairnioideae.

Abstract

Population genetic structure of the ironstone outcrop bromeliad, *Dyckia*

leptostachya: high gene flow among populations and conservation implications.

Studies that involve the genetic diversity of plants are fundamental in the establishment of conservation strategies, since they can estimate the adaptive potential of the populations. The present study described the patterns of population genetic structure, genetic diversity, and gene flow in *Dyckia leptostachya*, which occurs in ironstone outcrops in Mato Grosso do Sul state, Brazil. Six heterologous nuclear microsatellite loci were used for genetic analyses. The five populations of *D. leptostachya* presented high rates of genetic diversity ($H_O = 0.530$ and $H_E = 0.862$), moderate genetic structuring ($F_{ST} = 0.073$), as well as the number of effective migrants varying between 1.877 and 6.835 individuals per generation. The populations showed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium, with an inbreeding coefficient of 0.390. The highest allelic richness was 8.35 alleles for the population of the Municipal Natural Park of Piraputangas I. A great genetic variation (96.64%) was observed within populations. Low to moderate levels of genetic differentiation between populations were found with pairwise F_{ST} comparisons, ranging from 0.034 to 0.101. Bayesian analyses revealed that *D. leptostachya* is composed of only two genetic groups. The number of effective migrants per generation was high, which maintains the cohesion of populations with high gene flow. The alogamy associated with vegetative reproduction may be responsible for the high levels of genetic diversity found for the species. Our results demonstrated the significance of conservation units for species preservation, as well as, that different populations are necessary for the maintenance of a species as an evolutionary unit. **Keywords:** Bromeliaceae, Central Brazil, Genetic diversity, microsatellites, Pantanal, Pitcairnioideae.

Introdução

A família Neotropical Bromeliaceae Juss. exibe notável variabilidade em termos de morfologia, fisiologia, hábito, habitat e interação planta-animal, na qual, a seleção de fontes de captação de água e nutrientes, aparentemente, tem exercido um importante impulso para a evolução na família (Cruz 2013). Devido à ampla variedade de características adaptativas, Bromeliaceae possui espécies distribuídas em grande parte dos ecossistemas americanos, principalmente nas florestas tropicais, campos rupestres e savanas, a exceção de uma única espécie que ocorre no continente Africano (Smith e Downs 1974; Porembski e Barthlott 2000).

Em vista da importância ecológica, econômica e cultural de Bromeliaceae, estudos sobre genética populacional têm buscado entender os processos históricos que levaram aos atuais padrões de variabilidade genética e têm sido fundamentais para inferir estratégias de conservação, principalmente na Mata Atlântica, o centro de diversidade das bromélias no Brasil (Alves et al. 2004; Barbará et al. 2007, 2009; Palma-Silva et al. 2007, 2009; Hmeljevski et al. 2011; Zanella et al. 2011, 2012; Goetze et al. 2013; Goetze et al. 2015). Embora a Mata Atlântica apresente a maior biodiversidade de Bromeliaceae no Brasil (Leme e Marigo 1993), outros ecossistemas como os *inselbergs* ou cangas apresentam grande biodiversidade e alta taxa de endemismo de bromélias (Wanderley e Martinelli 1987); contudo, poucos trabalhos de genética populacional foram conduzidos nestas formações rochosas e vegetacionais específicas (Cavallari et al. 2006; Palma-Silva et al. 2011; Lavor et al. 2014; Gonçalves-Oliveira et al. 2017), as quais vem sofrendo pela ação antrópica destrutiva de seu habitat.

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. é composto por aproximadamente 160 espécies e pertence à subfamília Pitcairnioideae (Smith e Downs 1974), tendo o

Cerrado como seu centro de diversidade (Versieux e Wendt 2007; Krapp et al. 2014). *Dyckia* é formado por plantas perenes, de hábito terrestre ou saxícola (Smith e Downs 1974), nas quais não se observa a formação de um tanque para o acúmulo de água (particularidade observada na maioria das espécies de Bromeliaceae), característica essa que possibilitou ao gênero sobreviver em ambientes xeromórficos (Crayn et al. 2004).

As espécies de *Dyckia*, em sua maioria, estão concentradas em Campos Rupestres, apresentando um alto grau de endemismo. Estes ambientes são historicamente sujeitos a exploração antrópica, principalmente por desmatamentos, extrativismo e mineração, causando a diminuição do habitat natural (Silva e Andrade 2005; Versieux et al. 2008).

O processo de fragmentação e modificação dos habitats naturais causam a erosão genética, fato preocupante, pois a perda de variabilidade influencia diretamente na adaptação dos indivíduos e na viabilidade em curto prazo das populações remanescentes (Frankham 2005). Portanto, a pesquisa sobre a diversidade genética da população é essencial para fornecer informações sobre o risco de extinção de espécies e para inferir estratégias de conservação efetivas (Frankham et al. 2004; Andreou et al. 2011).

Buscando suprir a carência de conhecimento científico sobre aspectos genéticos e biológicos da flora de bancadas lateríticas, afloramentos rochosos também conhecidos como cangas, e da família Bromeliaceae, o presente trabalho teve como objetivo geral contribuir com informações acerca da diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Dyckia leptostachya* Baker, as quais são importantes para o estabelecimento de estratégias de manejo e conservação da espécie. Nossos objetivos específicos foram: (1) descrever a variabilidade genética e estimar a estrutura genética dentro e entre populações de *Dyckia leptostachya* nas regiões de bancadas lateríticas

no Maciço do Urucum-MS; e (2) avaliar o fluxo gênico entre populações isoladas nas diferentes bancadas lateríticas.

Material e métodos

Espécie e área de estudo

Dyckia leptostachya Baker é uma espécie de distribuição ampla, ocorrendo no sudeste da Bolívia, nordeste da Argentina, Paraguai, nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e na região sul do Brasil (Smith e Downs 1974; Reitz 1983). É uma erva perene, terrestre, que atinge cerca de 1,0 a 1,5 m com o escapo floral. O período de floração ocorre de abril a maio e de outubro a dezembro, com inflorescências simples e flores vermelho-alaranjadas (Smith e Downs 1974), os frutos são deiscentes e aparecem entre dezembro e fevereiro (Pott e Pott 1994; Fig. 1). No Mato Grosso do Sul, *D. leptostachya* é encontrada no Planalto Residual do Urucum, localizado nas cidades de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul (MS), o qual se caracteriza pela mata semidecídua dos morros e pela vegetação de bancadas lateríticas, além de matas de galeria associadas aos cursos d'água dos morros Rabicho e Urucum (Takahasi 2010).

As coletas foram realizadas no período de maio a junho de 2015 e junho de 2016, em regiões de bancadas lateríticas, nas Fazendas São Sebastião do Carandá (19° 06' S, 57° 31' O), Monjolinho (19° 16' S, 57° 31' O), São João (19° 10' S, 57° 32' O), e Parque Natural Municipal de Piraputangas I (19° 17' S, 57° 37' O) e Piraputangas II (19° 16' S, 57° 37' O; Fig. 2). As características ambientais dessa região impõem às plantas severas condições de suprimento de água devido à pequena profundidade do

substrato, que por sua vez, condiciona temperaturas elevadas e rápida evaporação (Prado e Gibbs 1993).

Amostragem populacional e extração de DNA

Um total de 150 indivíduos de *D.leptostachya* foi amostrado em cinco populações distribuídas em regiões de bancadas lateríticas, ao longo do Maciço do Urucum, Corumbá-MS. Foram coletados 30 indivíduos de cada população. As populações encontram-se distantes cerca de 10 km uma da outra. Uma folha jovem de cada indivíduo foi coletada, as quais foram armazenadas em sílica gel até o momento da extração de DNA.

Para evitar a amostragem de clones, os indivíduos de *D. leptostachya* foram coletados com no mínimo 10 m de distância entre si. O DNA genômico foi extraído segundo protocolo de Doyle e Dickson (1987). As extrações de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1%, corados com Syber Green (Invitrogen), em comparação com marcador de peso molecular DNA fago λ .

Marcadores moleculares e genotipagem

Após quantificação dos DNAs foram selecionadas as melhores amostras para realizar as PCRs, nesse caso, as análises utilizando SSRs nuclear foram realizadas com 96 indivíduos, amostrados nas cinco populações de *Dyckia leptostachya* das bancadas lateríticas de Corumbá-MS, sendo 14 indivíduos coletados nas fazendas São João e Monjolinho, 19 indivíduos coletados na fazenda Carandá, 25 indivíduos no Parque Municipal do Piraputangas I e 24 indivíduos coletados no Parque Municipal do Piraputangas II.

Foram testados 19 marcadores moleculares nucleares do tipo microsatélites descritos para diferentes espécies de bromélias (Zanella et al. 2012; Wöhrmann et al. 2012; Goetze et al. 2013; Wöhrmann et al. 2011; Tabela 1). Após os testes, seis marcadores apresentaram um padrão polimórfico de amplificação: Acom_71.3 e Acom_119.1 (*Ananas comosus*, Bromelioideae – Wöhrmann e Weising 2011); Ac11(*Aechmea caudata*, Bromelioideae – Goetze et al. 2013); Dd1 (*Dyckia distachya*, Pitcairnioideae, não publicado); Dd10 e Dd20 (*Dyckia distachya*, Pitcairnioideae – Zanella et al. 2012).

As amplificações por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em volume de 10 µL contendo: 10 ng de DNA, 1X de tampão da enzima, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPmix, 1 pmol de iniciador direto, 4 pmol de iniciador reverso, 0,4 pmol de iniciador M13 (Schuelke, 2000) marcado com diferentes fluorescências (6-FAM, VIC, NED ou PET), e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Go Taq, Promega). As reações foram amplificadas em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando um programa de ciclos do tipo “touchdown” com as condições de amplificação conforme descrito por Palma-Silva et al. (2007). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com SyberGreen, sob corrente elétrica contínua de 80 mA em tampão TBE 1X. O tamanho dos fragmentos (bandas) foi estimado em comparação com um marcador de peso molecular DNA ladder de 100pb. Os géis foram interpretados quanto à presença (+) e ausência (-) de bandas, ou bandas fracas (w). Os fragmentos amplificados com a fluorescência foram genotipados em sequenciador automático (ABI 3700 Applied Biosystems) pela empresa MacroGen, e comparados com padrão de tamanho molecular LIZ 500 (Applied Biosystems) usando o programa GeneMarker versão Demo 1.97 (SoftGenetics).

Análise de dados

Diversidade genética

Para as análises de diversidade genética foram estimados: o número de alelos por locos; o número de alelos privados (AP); a riqueza alélica (RS); a heterozigosidade observada (H_O); a heterozigosidade esperada (H_E); o F_{IT} – coeficiente total de endogamia; o F_{IS} – coeficiente de endocruzamento e o F_{ST} – índice de fixação. Todos estes parâmetros foram estimados com os programas MSA (DieringereSchlötterer 2003) e FSTAT 1.2 (Goudet 1995). Cada loco foi testado para desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) usando o programa FSTAT 1.2 (Goudet 1995). Para estimar os alelos nulos foi utilizado o programa MicroChecker 2.2.3 (Oosterhout et al. 2004).

Estrutura genética

Para a análise da estrutura genética das populações foi utilizada a estatística F para estimar a diversidade genética dentro e entre as populações e inferir o grau de subdivisão das mesmas usando o software Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer 2010). Foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) para identificar os padrões de estruturação genética no programa Arlequin 3.5. Também foi realizada uma análise Bayesiana para estimar o número de grupos genéticos (K) com o programa Structure 2.3.2 (Pritchard et al. 2000). A proporção de associação em cada agrupamento foi calculada sem considerar as localidades amostradas. A análise foi realizada sob o modelo de mistura, assumindo frequências alélicas independentes e utilizando um período de “burn-in” de 50.000, e corridas de 300.000 comprimentos e 10 interações para cada K , que variou de um a sete, para confirmar a estabilização das estatísticas (Pritchard et al. 2000). Para determinar o número de grupos genéticos utilizou-se o

critério proposto por Evanno et al. (2005), utilizando o programa Structur e Harvester v0.6.93 (Earl e VonHold 2012). A diferenciação genética foi avaliada usando estimativas de F_{ST} (Weir e Cockerham 1984) e calculada no GenAlex 6.5.01 (Peakall e Smouse 2012). A análise de estruturação genética (F_{ST}) par a par entre as populações foi realizada no GenAlex 6.5.01 (Peakall e Smouse 2012). O número efetivo de migrantes (N_m) entre as populações foi calculado com base na teoria coalescente usando a inferência Bayesiana com o MIGRATE v3.2.1 (Beerli e Felsenstein 1999).

Resultados

Amplificação heteróloga de locos de microssatélite nucleares

Dos 19 locos testados descritos para a família Bromeliaceae, 10 amplificaram em *Dyckia leptostachya* (Tabela 1). Porém, quatro deles amplificaram em poucos indivíduos, apesar das várias tentativas de otimização de protocolos realizadas (dados não mostrados). Desta maneira, apenas seis locos foram utilizados para as análises de diversidade e estrutura genética de populações.

Considerando os seis locos analisados, foram observados em média 22 alelos por loco e um total de 134 alelos, variando de 17 a 34 alelos por loco (Tabela 2). As heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) por loco variaram de 0,164 a 0,761 e 0,819 a 0,891, respectivamente. Em média, H_O e H_E apresentaram valores de 0,530 e 0,862, respectivamente. O coeficiente total de endogamia (F_{IT}) variou de 0,196 a 0,848, com valor médio de 0,437, e o índice de fixação (F_{ST}) variou de 0,022 a 0,128, com valor médio de 0,071. Em média, o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) foi de 0,390, e variou de 0,167 a 0,845. Todos os locos apresentaram desvios significativos

do HWE ($P < 0,05$; Tabela 2). Foi observado a presença de alelos nulos em dois marcadores, Acom_71 e Acom_119.

Diversidade genética

As cinco populações de *D. leptostachya* apresentaram altos índices de diversidade genética (Tabela 3). A população do Parque Natural Municipal do Piraputangas I (PPI) apresentou o maior número de alelos (71), enquanto que a população com menor número de alelos (42) foi a da Fazenda São João (SJ). A população do PPI também apresentou o maior número de alelos privados (8 alelos), seguido das populações Fazenda Monjolinho (MO) que apresentou 4 alelos privados, Fazenda Carandá (CA) com 3 alelos privados, e as populações Fazenda São João (SJ) e do Parque Municipal do Piraputangas II (PPII) não apresentaram alelos privados. Os resultados obtidos também mostraram um alto valor de riqueza alélica nas cinco populações de *D. leptostachya*, variando de 6,42 a 8,35, sendo que PPI e PPII apresentaram a maior riqueza alélica entre as populações 8,35 e 7,35, respectivamente (Tabela 3). Os valores de heterozigosidade observada variaram de 0,442 a 0,665 em MO e SJ, respectivamente, e de heterozigosidade esperada de 0,843 a 0,897 em MO e PPI, respectivamente. O coeficiente de endocruzamento apresentou valores altos e significativos para todas as populações.

Estrutura genética

A análise bayesiana do STRUCTURE identificou dois agrupamentos genéticos ($K = 2$; Fig.3 e 4). O grupo genético 1 predominou nas populações das fazendas CA e

SJ, e o grupo genético 2 predominou nas populações MO e PPI. A população PPII apresentou o maior grau de mistura genética entre os dois grupos (Fig. 5).

A análise de variância molecular (AMOVA) das populações de *D. leptostachya* mostrou que a maior proporção da variação genética ocorre devido a diferenças dentro das populações (91,62%), e a menor entre populações (8,37%; Tabela 4). A diferenciação genética entre as populações foi moderada (Wright 1978), com $F_{ST}=0,073(P< 0,001$; Tabela 4). Na análise de estruturação genética par a par, encontramos evidências de estruturação em todas as populações, com exceção da comparação entre as populações Carandá e São João que apresentaram o menor valor de estruturação 0,034. O maior valor de estruturação ocorreu entre as populações São João e Monjolinho 0,101 (Tabela 5). O número de migrantes entre as populações variou de 1,43 da população CA para a PPI, e 6,83 da população PPI para PPII (Fig. 5).

Discussão

Diversidade genética

Dyckia leptostachya apresentou sucesso de amplificação heteróloga em 10 loci, porém devido a dificuldade de amplificação em todos os indivíduos, apenas 6 loci foram utilizados para inferir os padrões de diversidade genética. Apesar de utilizar apenas 6 loci, *D. leptostachya* apresentou a maior taxa de sucesso de amplificação, quando comparado com o encontrado na literatura para espécies de bromélias (Barbará et al. 2007; Palma-Silva et al. 2007; Paggi et al. 2008). Palma-Silva et al. (2009), em trabalho realizado com *Vriesea gigantea* utilizaram sete marcadores heterólogos em

seu estudo. Barbará et al. (2009), em estudos realizado com quatro espécies do gênero *Alcantarea* utilizaram seis marcadores desenvolvidos para outras espécies. Já em estudo conduzidos com *Aechmea winkleri* foram utilizados somente três marcadores heterólogos (Goetze et al. 2015).

Dyckia leptostachya apresentou altos índices de diversidade genética em todas as populações estudadas. A heterogossidade observada variou de 0,442 a 0,665, valores próximos aos observados para outras espécies de bromélias, como *Aechmea caudata* ($H_O = 0,467$; Goetze et al. 2013), *V.gigantea* ($H_O = 0,424$; Palma-Silva et al. 2009) e *Alcantarea rearegina* ($H_O = 0,485$; Barbará et al. 2009), e maiores que os observados para *A.geniculata* ($H_O = 0,357$; Barbará et al. 2007), *A.imperialis* ($H_O = 0,362$; Barbará et al. 2007), *A. glaziouana* ($H_O = 0,299$; Barbará et al. 2009), e *Bromelia antiacantha* ($H_O = 0,335$; Zanella et al. 2011).

Dyckia leptostachya exibiu um excesso de genótipos homozigotos em todas as populações avaliadas, similar aos relatados anteriores para outras espécies de bromélias que utilizaram marcadores microssatélites nucleares (Cascante-Marín et al. 2005; Barbará et al. 2007; Palma-Silva et al. 2009). O alto coeficiente de endocruzamento observado indicando um excesso de homozigotos pode ser atribuído ao fato da espécie apresentar reprodução clonal (observação pessoal), o que facilita a manutenção dos “genets” e da variabilidade encontrada, como sugerido em outros estudos (Murawski e Hamrick 1990; Sarthou et al. 2001).

A propagação clonal pode ser extremamente importante para espécies que, como *D. leptostachya* ocorrem em ambientes com condições adversas (rocha exposta e período de seca e cheia) tanto para a formação como para a manutenção de suas populações. Além disso, pode ajudar a diminuir a perda da diversidade genética dentro das populações (Rogalski et al. 2009; Loh et al. 2015), uma vez que a reprodução clonal

é reconhecida por aumentar o tempo de geração, promovendo a sobreposição de muitas gerações (Orive 1993; Young et al. 1996; Loh et al. 2015). Em um estudo realizado com *Aechmea tuitensis*, Izquierdo e Pinero(2000) concluíram que a reprodução clonal preserva os genótipos, contrariando o efeito da deriva genética nesta espécie.

A população do Parque Municipal do Piraputangas I apresentou o maior índice de diversidade genética entre as populações, assim como o maior número de alelos privados e índice de riqueza alélica, demonstrando a importância que as unidades de conservação têm na permanência das espécies à longo prazo. A diversidade genética é um dos fatores-chave sobre os quais a seleção natural irá atuar, permitindo a adaptação e evolução das espécies frente às mudanças ambientais (Frankham et al. 2002; Goetze et al. 2015). Assim, para que as populações de *Dyckia leptostachya* permaneçam a longo prazo, os níveis atuais de diversidade genética devem ser mantidos e os fatores que podem levar a endogamia, como a fragmentação do habitat e a diminuição das populações devido à atividades antrópicas, devem ser monitorados.

Estrutura genética

Os resultados dos índices de diferenciação genética e as comparações par a par do F_{ST} sugerem níveis moderados de diferenciação genética entre as populações de *Dyckia leptostachya*. Este padrão também foi confirmado pelo resultado da AMOVA, que mostrou que apenas 8,37% da variabilidade genética se deve a diferenças entre as populações. Segundo Fischer et al. (2000) espécies alógamas, ao contrário das autógamias, tendem a apresentar altos índices de variabilidade genética e baixa diferenciação genética entre as populações, o que parece ser consistente com os resultados de *D. leptostachya*, a qual apresenta auto-incompatibilidade, e também, apresenta reprodução clonal (observação pessoal).

A análise bayesiana revelou que *D. leptostachya* é composta por dois grupos genéticos misturados entre as cinco populações (Fig. 4). As populações Carandá e São João apresentaram o mesmo perfil genético, corroborando com o resultado do F_{ST} par a par de 0,034, assim como a localização geográfica dessas populações que se encontram mais próximas entre si. Apesar das populações do Piraputangas I e Monjolinho estarem mais distantes geograficamente, elas também agruparam, porém apresentaram valores consideráveis de $F_{ST}=0,055$. A população do Parque Municipal do Piraputangas II apresentou o maior grau de mistura genética. *D. leptostachya* apresentou a maior variação molecular dentro das populações (91,62%). Em estudo com populações de *Aechmea winkleri* também foi observada a ocorrência de alta porcentagem de variação molecular dentro das populações (96,64%), e apesar das populações de *A. winkleri* não estarem bem estruturadas, houve a formação de dois grupos genéticos na análise bayesiana (Goetze et al. 2015). Esses resultados apontam para níveis elevados de fluxo de genes entre as populações, o que foi confirmado pelo alto Número de migrantes por geração de *Dyckia leptostachya* ($N_m= 1,87-6,83$), próximos ao encontrado em *Aechmea winkleri* ($N_m= 1,19-4,09$; Goetze et al. 2015).

Os valores de F_{ST} de *D. leptostachya* variaram de 0,034 a 0,101, próximos aos observados em *A. geniculata* ($F_{ST}= 0,111$; Barbará et al. 2007), estando este resultado relacionado a conectividade entre as populações e a sua distribuição geográfica restrita. Quando comparados com outras duas bromélias *A. regina* ($F_{ST}= 0,195$; Barbará et al. 2009) e *B. antiacantha* ($F_{ST}= 0,224$; Zanella et al. 2011), *D. leptostachya* apresentou índices de F_{ST} moderados, porém maiores que os observados em *A. winkleri* que variaram de 0,021 a 0,075 (Goetze et al. 2015).

Os resultados encontrados no presente estudo indicam haver uma conectividade entre as populações, demonstrando que as morrarias em torno das bancadas lateríticas

não estão sendo uma barreira geográfica para estas populações, apesar destas estarem espacialmente separadas. Essa conectividade pode estar relacionada aos polinizadores de *D.leptostachya* representados por beija-flores e borboletas (dados não publicados), assim como o modo de dispersão de sementes, possivelmente hidrocórica (observação pessoal), pois apesar da distância entre as populações estudadas, cerca de 5 a 10 km, pode-se observar a ocorrência de indivíduos isolados em toda a região, o que pode ser de grande valor para o fluxo gênico entre as populações, contribuindo para a sua conexão.

Conclusões

Nossos resultados mostraram que as populações de *Dyckia leptostachya* ainda conservam altos níveis de diversidade genética, e possuem alto fluxo gênico. O fato de ser uma espécie auto-incompatível provavelmente contribui para a manutenção dessa diversidade. Os níveis moderados de estruturação genética permitem inferir que as populações foram fundadas por indivíduos geneticamente diversos e que foram capazes de manter a diversidade ao longo do tempo. A propagação vegetativa via estolões também pode ser responsável pela manutenção dos genótipos nas populações. Apesar de *D.leptostachya* ter ampla distribuição, já se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul, na categoria vulnerável (Rio Grande do Sul 2014), sendo que em Santa Catarina a espécie é considerada possivelmente extinta (Consema 2014). Nas bancadas lateríticas do Mato Grosso do Sul, *D. leptostachya* ainda apresenta considerável diversidade genética, principalmente na unidade de conservação do Parque Municipal de Piraputangas, populações I e II, onde foram encontrados os maiores índices de diversidade genética. Porém, o constante extrativismo devido a atividades de pecuária e queimadas, coloca em risco a

permanência das populações que se encontram nas fazendas, indicando a necessidade de esforços de monitoramento e conservação dessas populações, principalmente para possibilitar a manutenção do fluxo gênico entre elas.

Agradecimentos

Agradecemos pelo apoio financeiro à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), através das Chamadas FUNDECT/CNPq N° 03/2009 – DCR, FUNDECT/CNPq N° 05/2011–PPP, FUNDECT N° 11/2014 – UNIVERSAL-MS; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Edital UNIVERSAL 2014, processo n° 457698/2014-4; e ao CNPq pela concessão da bolsa produtividade à Gecele M. Paggi.

Referências bibliográficas

Alves GM, Filho AR, Puchalski A, Reis MS, Nodari RO, Guerra MP (2004).

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

Andreou M, Delipetrou P, Kadis C, Tsiamis G, Bourtzis K, Georghiou K (2011) An integrated approach for the conservation of threatened plants: the case of *Arabis kennedyae* (Brassicaceae). Acta Oecol 37: 239-248

- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2009) Genetic relationship 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
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata*. *Mol Ecol* 16:1981-1992
- Beerli, P. and J. Felsenstein (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population umbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152:763-773
- Cascante-Mar AJGB, Oostermeijer JHD, Wolf JCM, Den N (2005) Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhiagladiflora* in a premontane tropical forest. *Plant Biol* 7:203-209
- Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI, Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Epinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodivers Conserv* 15: 4357-4373
- Consema- Conselho Estadual de Meio Ambiente de Santa Catarina (2014) Resolução Consema Nº 51, de 5 de dezembro de 2014. Reconhece a Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado de Santa Catarina e dá outras providências. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/upload/Flora/resconsema51.pdf> acessado 10 de novembro de 2016).

- Crayn DM, Winter K, Smith JAC (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. PNAS 101:3703-3708
- Cruz GAS (2013) Filogenia molecular, Evolução e Biogeografia do gênero *Cryptanthus* Otto & Dietr. (Bromeliaceae). Tese, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco
- Dieringer D, Schlotterer C (2003) Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Mol Ecol Notes 3:167-169
- Doyle JJ, Dickson EE (1987) Preservation of Plant Samples for DNA Restriction Endonuclease Analysis. Taxon 36:715-722
- Earl DA, Holdt BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour 4: 359-361
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14:2611-2620
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10:564-567
- Fischer M, Husi R, Prati D, Peintinger M, Kleunen MV e Schmid B (2000) RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). Am J Bot 87:1128-1137.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. Bio Cons 126:131-140
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, New York, pp. 617

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) A Primer of Conservation Genetics.
University Press, Cambridge
- Goetze M, Büttow MV, Zanella CM, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro FG, Sampaio JAT, Palma-Silva C, Cidade FW, Bered F (2015) Genetic Variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochem Syst Ecol* 58:204-210
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochem Syst Ecol* 48:194-198
- Gonçalves-Oliveira RC, Wöhrmann T, Benko-Iseppon AM, Krapp F, Alves M, Wanderley MGL, Weising K (2017) Population genetic structure of the rock outcrop species *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae): the role of pollination vs. seed dispersal and evolutionary implications. *Am J Bot* 104:1-11
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485-486
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos Trans R Soc B* 351:1291-1298
- Hmeljevski KV, Reis A, Montagna T, Reis MS (2011) Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. *Conserv Genet* 12:761-769
- Izquierdo LY, Pinero D (2000) High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Aust J Bot* 48:645-650
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, Weising K (2014) Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and

- nuclear sequences. *Plant Syst Evol* 300:1591-1614, DOI 10.1007/s00606-014-0985-0
- 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. *Am J Bot* 101:1167-1175
- Leme EMC, Marigo LC (1993) Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro, pp. 183
- Loh R, Scarano FR, Ferreira MA, Salgueiro F (2015) Clonality strongly affects the spatial genetic structure of the nurse species *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 1-13
- Murawski DA, Hamrick JL (1990) Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad *Aechmea magdalenae*. *Am J Bot* 77:1201-1208
- Oosterhout V, Hutchinson W, Wills D, Shipley P (2004) micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538
- Orive ME (1993) Effective population size in organisms with complex life-histories. *Theor Popul Biol* 44:316-340.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Cidade FW, Souza ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C, Bered F (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Research* 8:980-982
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Mol Ecol Notes* 7: 654-657

- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103:503-512
- 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. *Mol Ecol* 20: 3185-3201
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537–9. pmid:22820204
- Porembski S, Barthlott W (2000) Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecol* 151:19-28
- Pott A, Pott VJ (1994) Plantas do Pantanal. EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, MS
- Prado DE, Gibbs PE (1993) Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. *Ann Missouri Bot Gard* 80:902-927
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Reitz R. (1983) Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. In: Reitz R. Flora Ilustrada Catarinense (Fasc. Brom.). Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, SC, pp. 559
- Rio Grande do Sul (2014) Decreto 52.109 de 19 de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20141222103647doe.pdf> acessado em 10 de novembro de 2016

- Rogalski JM, Reis A, Reis MS, Hmeljevski KV (2009) Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Bot 32:691-702.
- Sarthou C, Samadi S, Boisselier-Dubayle MC(2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. Am J Bot 88: 861-868
- Schuelke M(2000)An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat Biotechnol 18:233-234. doi:10.1038/72708
- Silva AJR e Andrade LHC (2005) Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. Acta Bot Bras 19:45- 60
- Smith LB, Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcarnioideae). Fl Neotrop Monogr 14:1- 662
- Takahasi A (2010) Ecologia da vegetação em bancadas lateríticas em Corumbá, MS. Tese, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Versieux LM, Wendt T (2007) Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. Biodivers Conserv 16:2989-3009
- Wanderley MGL & Martinelli G. 1987. Bromeliaceae. In Giulietti, A.M., N.L. Menezes, J.R. Pirani, M. Meguro, and M.G.L. Wanderley. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista das espécies. Bol. Bot. Univ. São Paulo, 9:1– 151
- Versieux LM, Wendt T, Louzada RB, Wanderley MGL (2008) Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. Megadiversidade 4:99-110
- Weir BS, Cockerham CC(1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:358-1370

- Wörhmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K (2012) Development of 15 nuclear microsatellites markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conserv Genet Resour* 5:81-84. doi 10.1007/s12686-012-9738-y
- Wörhmann T, Weising K (2011) *In silico* mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor Appl Genet* 123: 635-647
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations. V. 4 – Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press, Chicago
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 11:413-418
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW, Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wildpopulations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 98:1511-1519
- Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Katchuck-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F (2012) Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genet Mol Biol* 35:1020-1026

Legendas das figuras

Fig. 1 Aspecto geral de *Dyckia leptostachya* com detalhes da inflorescência, fruto e folhas. (A) Indivíduo adulto. (B) Detalhe do escapo floral com lanugem (setas) e flores de coloração vermelho-alaranjadas. (C) Fruto deiscente. (D) Detalhe do escapo floral saindo do meristema lateral da base foliar.

Fig. 2 Locais de coleta das populações de *Dyckia leptostachya*, na Região do Planalto Residual do Urucum, no município de Corumbá, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. CA: Carandá, SJ: São João, PPI e PPII: Parque Natural Municipal de Piraputangas I e II e MO: Monjolinho.

Fig. 3 Magnitude de ΔK da análise da estrutura de K (média \pm SD mais de 10 repetições), calculado seguindo o método ΔK proposto por Evanno et al. (2005), para *Dyckia leptostachya* utilizando dados de microssatélites. Os valores modal destas distribuições indicam o verdadeiro K ou o mais alto nível de estrutura dois grupos genéticos.

Fig. 4 Proporções de mistura dos indivíduos de *Dyckia leptostachya* identificados pelo programa Structure através de análise Bayesiana, demonstrando $K = 2$ grupos genéticos, indicados em cores diferentes. (CA: Carandá, MO: Monjolinho, PPII e PPI: Parque Natural Municipal de Piraputangas II e I, SJ: São João).

Fig. 5 Número efetivo de migrantes entre as populações. (A) e (B) número efetivo de imigrantes: as setas aumentam de espessura conforme o aumento dos valores de

imigrantes. CA: Carandá, SJ: São João, PPI e PPII: Parque Natural Municipal de Piraputangas I e II e MO, Monjolinho.

Tabela 1. Teste de amplificação de 19 locos heterólogos de microssatélites nucleares para *Dyckia leptostachya*.

Espécie	Locos de microssatélite	Tamanho esperado	Amplificação*	Referências
<i>Dyckia distachya</i>	Dd01	200-250	+	Não publicado
	Dd02	150-200	-	Não publicado
	Dd03	202-212	-	Zanella et al. 2012
	Dd04	227-257	-	Zanella et al. 2012
	Dd05	200-230	-	Não publicado
	Dd06	170-220	-	Não publicado
	Dd07	201-213	w	Zanella et al. 2012
	Dd08	192-232	-	Zanella et al. 2012
	Dd09	176-228	-	Zanella et al. 2012
	Dd10	248-254	+	Zanella et al. 2012
	Dd011	240-250	-	Não publicado
<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> var. <i>estesvesii</i>	Dd013	155-210	-	Não publicado
	Dd20	200	+	Zanella et al. 2012
	ng_Dy24	227-253	w	Wöhrmann et al. 2012
	Ac11	198-208	+	Goetze et al. 2013
<i>Aechmea caudata</i>	Ac25	170-180	w	Goetze et al. 2013
	Ac55	147-165	w	Goetze et al. 2013
<i>Ananas comosus</i>	Acom_71.3	200	+	Wöhrmann et al. 2011
	Acom_119.1	213	+	Wöhrmann et al. 2011

(+) amplificação bem sucedida com mais de uma banda visualizada; (-) amplificação sem êxito; (w) amplificação fraca.

Tabela 2. Caracterização genética e estimativas da estatística F de Wright para seis locos de microssatélites em cinco populações naturais de *Dyckia leptostachya*.

Locos	A	H_O	H_E	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
Dd1	25	0,564	0,819	0,412	0,128	0,326*
Dd20	34	0,503	0,891	0,449	0,083	0,401*
Ac11	19	0,666	0,835	0,311	0,117	0,218*
Acom_71.3	19	0,522	0,869	0,409	0,041	0,381*
Dd10	20	0,761	0,875	0,196	0,036	0,167*
Acom_119.1	17	0,164	0,884	0,848	0,022	0,845*
Média	22	0,530	0,862	0,437	0,071	0,390

Abreviações: A=número de alelos por loco; H_O =heterozigosidade observada;

H_E =heterozigosidade esperada; F_{IT} =coeficiente total de endogamia; F_{ST} =índice de fixação; F_{IS} =coeficiente de endocruzamento.*Valores estatisticamente significativos para $P<0,05$, indicando que as populações não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3.Diversidade genética nuclear nas populações de *Dyckia leptostachya*.

Populações		N	A	A _P	R _S	H _O	H _E	F _{IS}
Carandá	CA	19	54	3	7,33	0,443	0,858	0,491*
Monjolinho	MO	14	48	4	7,15	0,442	0,843	0,489*
Piraputangas I	PPI	25	71	8	8,35	0,474	0,897	0,476*
PiraputangasII	PPII	24	58	0	7,35	0,626	0,866	0,281*
São João	SJ	14	42	0	6,42	0,665	0,847	0,222*

Abreviações: N=tamanho amostral; A=número de alelos; A_P=alelos privados;

R_S=riqueza alélica; H_O=heterozigosidade observada; H_E= heterozigosidade esperada;

F_{IS}=coeficiente de endocruzamento.*Valores estatisticamente significativos para

$P < 0,05$, indicando que as populações não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) para *Dyckia leptostachya*.

Fonte de variação	g.l.	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	F_{ST}	Valor de P
Entre populações	4	0,23	8,37	0,073	<0,001
Dentro das populações	187	2,60	91,62		<0,001

Tabela 5. Estimativa de F_{ST} par a par entre populações de *D. leptostachya* (diagonal inferior) e sua significância (diagonal superior) com base em seis locos de microssatélites. (CA: Carandá, MO: Monjolinho, PPII e PPI: Parque Natural Municipal de Piraputangas II e I, SJ: São João).

	CA	MO	PPII	PPI	SJ
CA	-	0,001	0,001	0,001	0,067
MO	0,094	-	0,001	0,001	0,001
PPII	0,056	0,080	-	0,001	0,006
PPI	0,054	0,055	0,052	-	0,001
SJ	0,034	0,101	0,039	0,062	-

Fig. 1

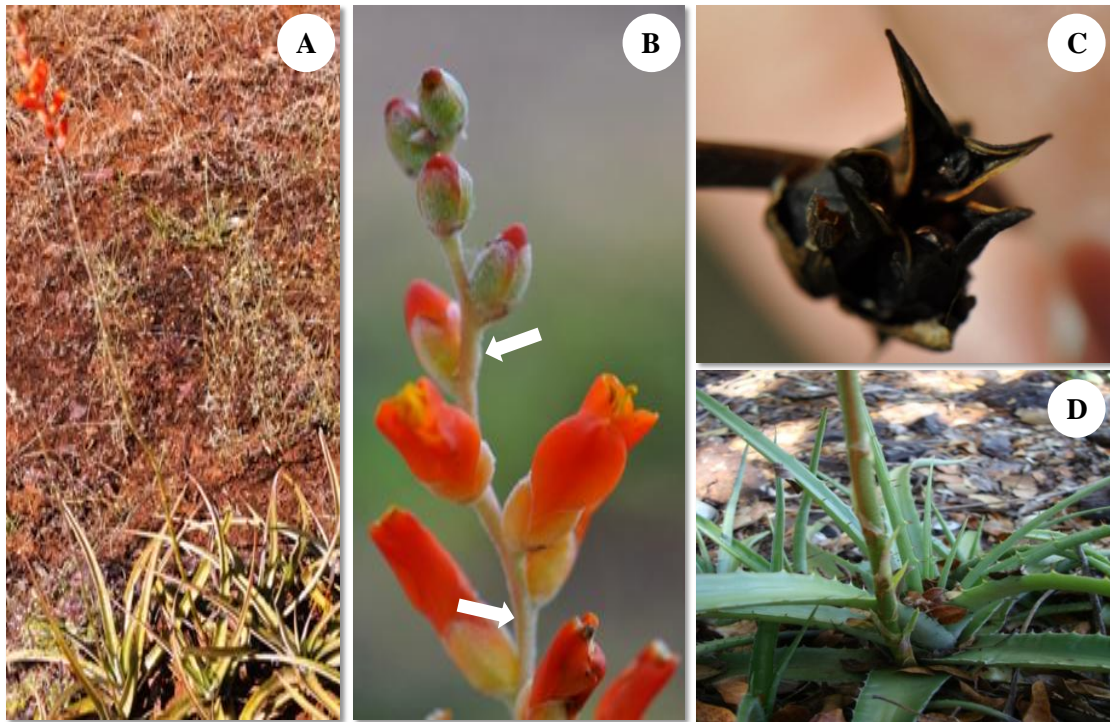


Fig. 2

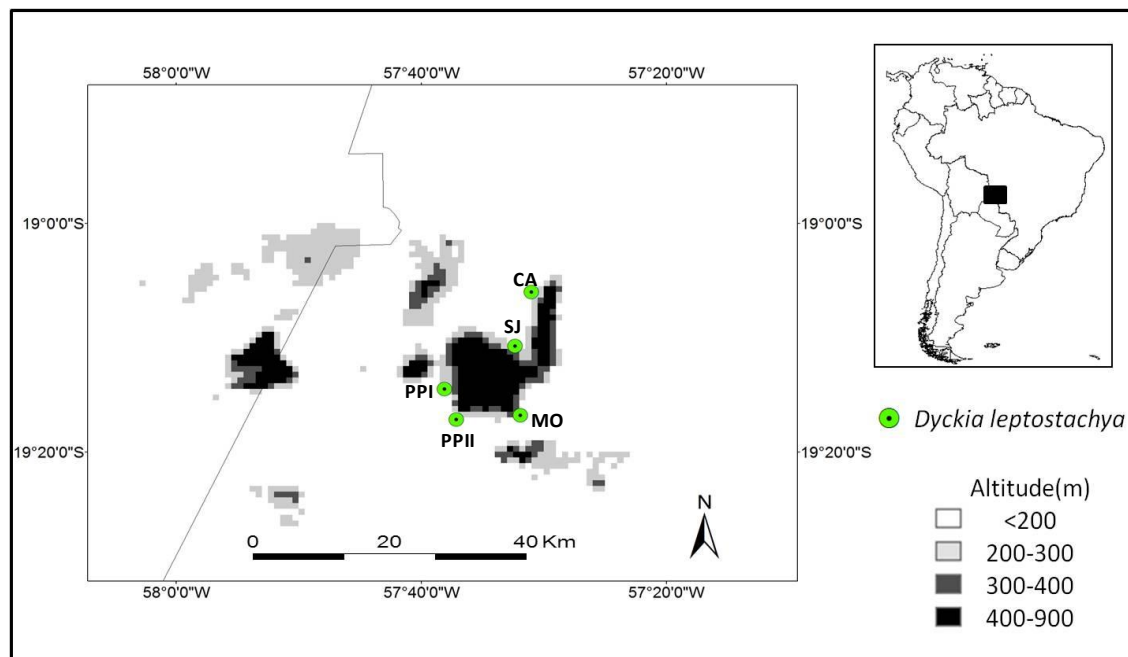


Fig. 3

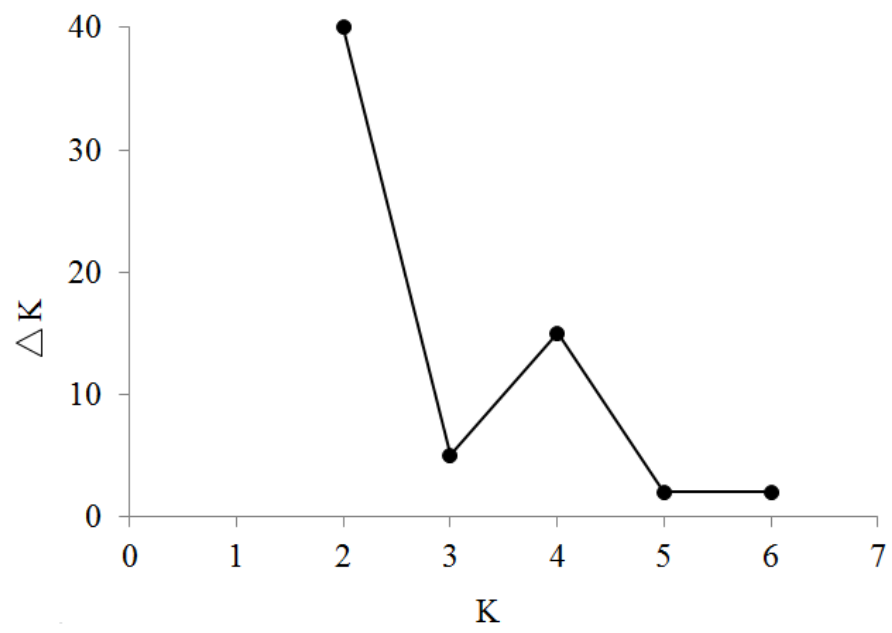


Fig. 4

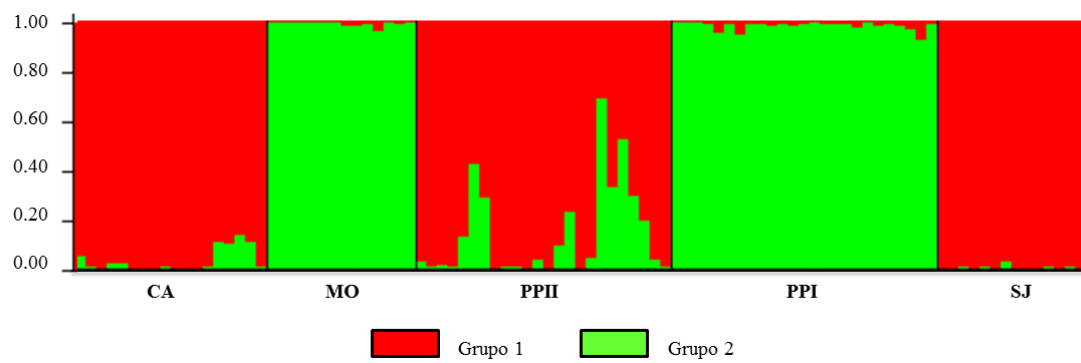
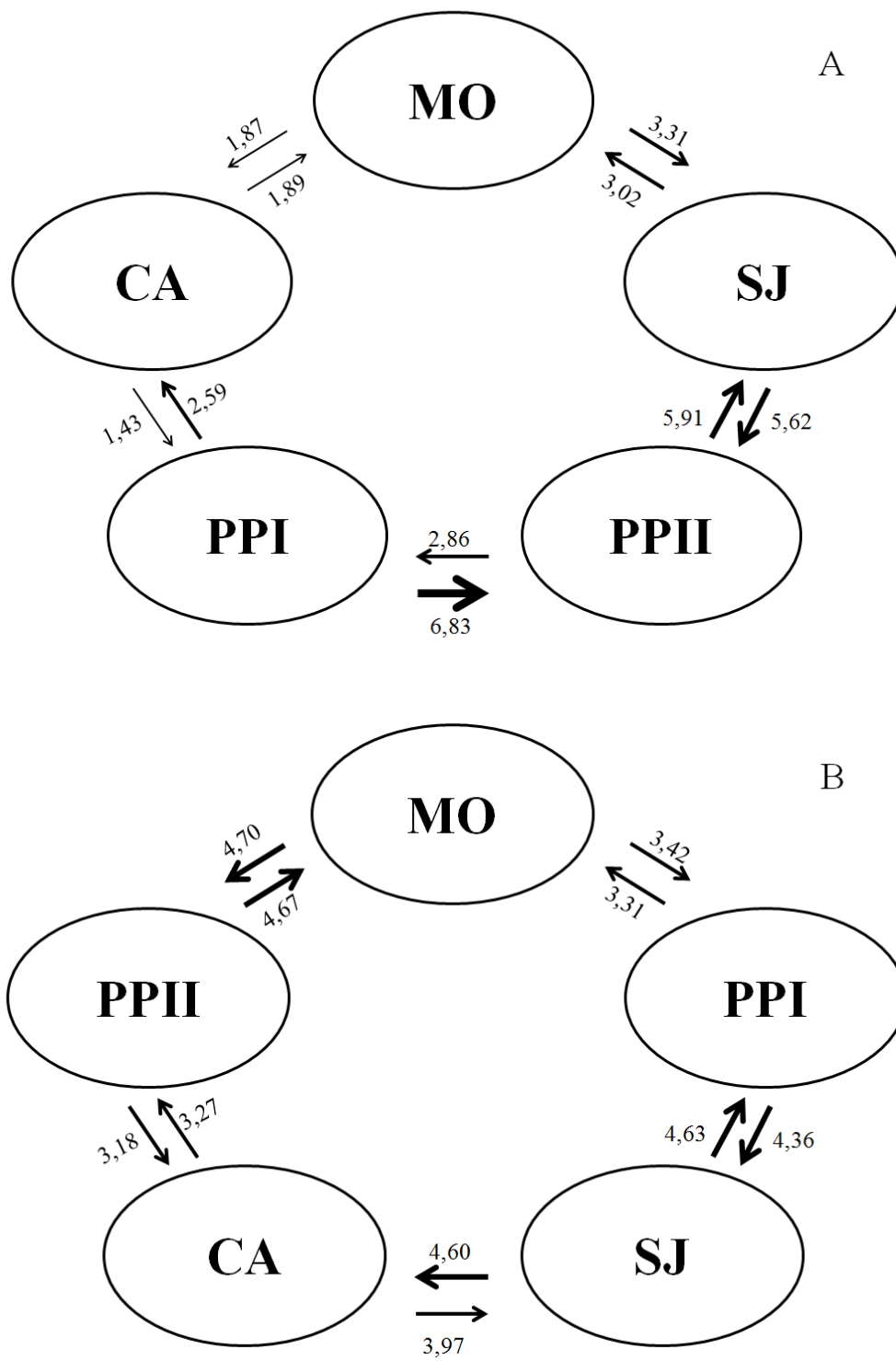


Fig. 5



5. Considerações finais

Este trabalho descreve os padrões de diversidade genética e estrutura genética de populações de *Dyckia leptostachya*, localizadas em bancadas lateríticas no Planalto Residual do Urucum, Corumbá - Mato Grosso do Sul (MS). *D. leptostachya* é uma espécie de ampla distribuição no Brasil, que ocorre em bancadas lateríticas, áreas com altos níveis de insolação, grande amplitude térmica e ausência de solo, impondo condições ambientais severas à espécie. Este trabalho é um dos primeiros estudos sobre aspectos genéticos e biológicos de uma espécie de Bromeliaceae de bancadas lateríticas do Mato Grosso do Sul.

Para descrever a diversidade genética de *Dyckia leptostachya*, utilizou-se marcadores de microssatélites nucleares que foram descritos para outras espécies de Bromeliaceae. Através das análises genéticas, este estudo demonstrou que as populações investigadas ainda conservam altos níveis de diversidade genética em comparação com os encontrados em outras espécies de bromélias. *Dyckia leptostachya* apresentou uma estruturação populacional moderada, com baixa diferenciação genética entre as populações e alto fluxo gênico. O sistema de cruzamento alógamo está provavelmente mantendo a conectividade e a homogeneização entre as populações.

A alta diversidade genética observada em *D. leptostachya* é importante para a sobrevivência e manutenção das populações naturais em longo prazo, porém ainda são necessárias estratégias de conservação para evitar o aumento da diferenciação genética e conservar os altos índices de diversidade genética encontrados. As duas populações do Parque Municipal de Piraputangas são as únicas populações que se encontram em área de Unidade de Conservação, e apresentaram os maiores índices de diversidade genética, ressaltando a importância da preservação de áreas para manutenção da

biodiversidade local. Porém as três populações que se encontram em fazendas são fundamentais para manter a variabilidade genética de todas as populações, e desta maneira, contribuir com os altos índices de diversidade genética observados nas populações do Parque, PPI e PPII.

Apesar dos altos índices de diversidade genética observados a fragmentação de seu habitat, devido a atividades de pecuária, queimadas, e também do constante extrativismo, colocam em risco sua permanência no ambiente, uma vez que as populações se encontram próximas a áreas de mineração. Desta forma, os resultados supracitados são importantes por fornecerem informações sobre a manutenção da variabilidade genética de uma espécie representativa da fitofisionomia de bancadas lateríticas da região sul-mato-grossense e também por subsidiar o estabelecimento de planos de manejo e conservação de *D. leptostachya*.

6. Anexos



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 13, DE 22 DE ABRIL DE 2014.

O COLEGIADO DE CURSO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, no uso de suas atribuições, **resolve:**

Art. 1º - Estabelecer critérios para elaboração de dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal conforme seguem:

1. Capa contendo o nome da instituição e do curso de pós-graduação, nome do aluno, título da dissertação, nome do orientador e do coorientador (se houver)
2. Contracapa contendo o nome da instituição e do curso de pós-graduação, nome do aluno, título da dissertação e o seguinte texto: “Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal junto ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde”
3. Dedicatória (opcional)
4. Agradecimentos (obrigatória a inclusão das Agências de Fomento)
5. Resumo e palavras-chave (três)
6. *Abstract* e *keywords*
7. Lista de Figuras e Tabelas (opcional)
8. Lista de Abreviaturas (opcional)
9. Sumário
10. Introdução Geral (citações de acordo com a revista *Brazilian Journal of Botany*)
 - 10.1 Objetivos Gerais e Específicos
 - 10.2 Referências Bibliográficas (de acordo com a revista *Brazilian Journal of Botany*)
11. Artigo(s) em português ou inglês, segundo normas de periódico científico indexado, escolhido pelo aluno e pelo orientador
12. Considerações Finais (opcional)
13. Anexos (opcional)

Aline Pedroso Lorenz Lemke,
Presidente.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 59282-1	Data da Emissão: 18/06/2017 20:57
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Brenda Baía Brandão	CPF: 042.125.911-62
---------------------------	---------------------

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
9	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outra.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMÍLIA	Bromeliaceae
2	REINO	Plantae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 48344219



Página 1/1