

CLÉBIA MARIA ALVES DE ALMEIDA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Aechmea fulgens* Brongn. (BROMELIACEAE) EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA EM PERNAMBUCO

Recife - PE
2006

CLÉBIA MARIA ALVES DE ALMEIDA

Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens*
Brongn. (Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em
Pernambuco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: Dra. Luciane Vilela Resende

Co-orientadora: Dra. Márcia Vanusa da Silva

Recife - PE
2006

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

A447d Almeida, Clebia Maria Alves de
Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn (Bromeliaceae) em fragmentos da Mata Atlântica em Pernambuco / Clébia Maria Alves de Almeida. -- 2006.
57 f. : il.

Orientadora: Luciane Vilela Resende
Dissertação (Mestrado em Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Departamento de Agronomia.
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 631.53

- 1 . Bromeliaceae
- 2 . Marcador Molecular
- 3 . Melhoramento
- 4 . Genética vegetal
- I . Resende, Luciane Vilela
- II . Título

Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn.
(Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco

Clébia Maria Alves de Almeida

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/____

Orientadora:

Dra. Luciane Vilela Resende
Departamento de Agronomia/UFRPE

Co-orientadora:

Dra. Márcia Vanusa da Silva
Departamento de Biologia/UFRPE

Examinadores:

Dra. Luiza Suely Semem Martins
Departamento de Biologia/UFRPE

Dra. Vivian Loges
Departamento de Agronomia/UFRPE

Dra. Karin Elisabeth Von Schmalz-Peixoto
Departamento de Biologia/UFRPE

Recife - PE
Junho-2006

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, pela excelente família e amigos que tive a felicidade de encontrar nessa jornada.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e incentivo constantes em minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Oliveira, que à frente da Coordenação da Pós-Graduação, colaborou sempre atenciosamente para a realização deste curso.

A Profa. Dra. Luciane Vilela Resende, pela orientação, pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho, por sua compreensão, paciência e amizade desfrutada por todo esse período.

Aos professores do Curso de Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas, Prof. Dr. Gerson Quirino, Prof. Dr. Clodoaldo Filho, Prof. Dr. Péricles e ao Prof. Dr. Dimas Menezes, pelos conhecimentos, experiências transmitidas e momentos de descontração, bem como aos professores que se empenharam para realização deste curso.

Agradecimento especial a Dra. Márcia Vanusa, com quem tive a grande oportunidade de trabalhar, pela preciosa orientação, amizade, incentivo, parceria e sobretudo por compartilhar com muita humildade todo o seu conhecimento, que contribuíram muito pra meu crescimento espiritual e profissional.

Ao Dr. Mairon Moura, pelo apoio, incentivo e sugestões no início desse trabalho.

Aos meus colegas de turma, Deivid Almeida, Jaqueline Gadé, Liliane Roberta, Lindinalva Gomes, Marcelo Santana, Mário Moraes, Roberto Melo e Silvokleio Costa pela amizade, convívio, por compartilhar momentos alegres e conhecimentos que contribuíram muito para o nosso crescimento pessoal e profissional.

A amiga Adriana Guedes, pela amizade, parceria no laboratório e nas análises estatísticas.

Ao meu grande amigo Alexandre Gomes, de quem tenho muito orgulho de compartilhar de sua amizade, agradeço pelo apoio, incentivo, pelas viagens em busca das bromélias e por estar sempre disposto a colaborar com bom humor e dedicação.

As amigas do LABBIO (Rural), Conceição Matiniano, Thatiana, Neilsa, pela amizade e colaboração dispensadas durante a realização desse trabalho.

Ao amigo Daniel Amaral, pela amizade e pela imensa colaboração no laboratório (bancada, fotografia e informática) sempre dispensada com dedicação e paciência.

Ao amigo Álvaro Carlos, pela amizade, pela ajuda na “caça” as bromélias e pelo contagiante bom-humor.

Aos amigos do Genoma-IPA, Rômulo Santos, Francinete Cavalcanti, Sue Ellen Nascimento , Anibia Vicente, pela amizade e colaboração.

A Dra. Virgínia Donato, pela colaboração, sugestões, amizade e oportunidade de realização de projetos junto ao CETENE.

A todos do Genoma (Rural), em especial a, Fabiana, Vladimir e Profa. Nara, pela amizade, pelo apoio e colaboração no inicio desse trabalho.

As amigas Maria do Carmo (IPA) e Márcia Galvão, pela amizade, torcida e apoio que me ajudaram a superar alguns dos momentos mais difíceis nessa caminhada.

Ao Biólogo Roberto Siqueira, proprietário do Refúgio Ecológico Charles Darwin, pela permissão de coletas, apoio e incentivo ao estudo.

A Fernando Galindo (IPA), pelas sugestões e contribuições para a melhoria do trabalho.

A Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), pela disponibilização do laboratório de Genoma, onde foi realizado este trabalho.

Ao CNPq/PADCT, pelo apoio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho.

Por fim, a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho,

MUITO OBRIGADA!!!

...“Leve na sua memória, para o resto da vida, as coisas boas que surgiram nas dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade e lhe dará confiança diante de qualquer obstáculo”.

Chico Xavier

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL	
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1. Mata Atlântica: caracterização, problemas, diversidade.....	3
2.2. A Mata Atlântica no Nordeste.....	5
2.3. Conseqüências genéticas da fragmentação	6
2.4. A família Bromeliaceae.....	7
2.4.1. O gênero <i>Aechmea</i>	8
2.4.2. <i>Aechmea fulgens</i> Brongn.	9
2.4.3. Descrição botânica.....	9
2.5. Estrutura genética de populações.....	10
2.6. Técnicas moleculares para o estudo da variabilidade genética em plantas.....	10
2.6.1. Marcadores microssatélites (SSR).....	12
2.6.2. Marcadores ISSR.....	14
2.7. Estudos de variabilidade genética em plantas por meio de marcadores moleculares.....	15
Referências.....	18
CAPÍTULO II: VARIAÇÃO GENÉTICA EM <i>AECHMEA FULGENS</i> (Brongn.) (BROMELIACEAE) DETECTADA POR MARCADORES SSR E ISSR.	
Resumo.....	25
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e Métodos.....	27
Resultados.....	31
Discussão.....	33
Conclusões.....	37
Referências.....	38
Anexos.....	42

Lista de Tabelas

Capítulo II

	Pg.
Tabela 1. Oligonucleotídeos de SSR, espécie derivada, respectivas seqüências de bases e tamanhos dos fragmentos amplificados em amostras de <i>Aechmea fulgens</i>	5
Tabela 2. Oligonucleotídeos de ISSR utilizados e respectiva seqüência de bases, número de fragmentos amplificados e o polimorfismo produzido em amostras de <i>A. fulgens</i>	6
Tabela 3. Diversidade genética molecular total para cada população de acordo com Percentual de locos polimórficos (P), Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (I) e Diversidade Genética de Nei (h), para cada população e marcadores moleculares estudados.	7
Tabela 4. Matriz de distância genética (marcadores SSR) de Nei (1978) (diagonal superior) e distância geográfica (diagonal inferior) entre pares de populações de <i>A. fulgens</i>	7
Tabela 5. Matriz de distância genética (marcadores ISSR) de Nei (1978) (diagonal superior) e distância geográfica (diagonal inferior) entre pares de populações de <i>A. fulgens</i>	7

Lista de Figuras

Capítulo II

	Pg.
Figura 1. Mapa de Pernambuco. Em destaque, área do domínio da Mata Atlântica e Municípios onde foram realizadas as coletas de <i>Aechmea fulgens</i> ,. Igarassu, São Lourenço da Mata e São Vicente Férrer.....	28
Figura 2. Figura 2. Dendrogramas de distâncias genéticas (SSR) de Nei (1978) entre três populações de <i>A. fulgens</i> . Pop 1: Igarassu; Pop 2: Tapacurá; Pop 3: S Vicente.	35
Figura 3. Figura 3. Dendrogramas de distâncias genéticas (ISSR) de Nei (1978) entre três populações de <i>A. fulgens</i> . Pop 1: Igarassu; Pop 2: Tapacurá; Pop 3: S Vicente.	35

Anexos

Anexo 1. Figura 1. Mapa do Estado de Pernambuco. Destacando os Municípios localizados no domínio da Mata Atlântica, onde foram realizadas as coletas de *Aechmea fulgens*.

Anexo 2. Figura 1. *Aechmea fulgens*. (a) Inflorescência; (b) hábito epífita; (c) *A. fulgens* var. *discolor*; (d) hábito terrestre.

Lista de Abreviaturas

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Análise de Variância Molecular
DNA	Acido desoxirribonucléico
GC	Guanina-Citosina
GT	Guanina-Timina
ha	Hectare
IPA	Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária
ISSR	Inter simple sequence repeat
ng	Nanograma
PCR	Polymerase Chain Reaction
pb	Pare de bases
RAPD	Random amplified polymorphism DNA
SSR	Simple sequence repeat
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UBC	University British Columbia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average

RESUMO

A fragmentação de habitats é a maior causa da erosão da biodiversidade nas florestas tropicais junto com a ação antrópica. Devido ao alto grau de fragmentação e ao isolamento dos remanescentes atuais da floresta atlântica, várias populações estão se extinguindo localmente e outras sofrendo perda de sua variabilidade genética. A família Bromeliaceae inclui uma grande variedade de espécies ornamentais tropicais. O gênero *Aechmea* tem significativa representatividade no Estado de Pernambuco, onde ocorrem onze espécies e, apesar de sua grande importância ecológica e econômica, existem poucos estudos sobre sua diversidade genética. *Aechmea fulgens* é uma espécie nativa da Mata Atlântica, cujas populações naturais podem estar sofrendo perda de sua variabilidade genética. A diversidade genética em plantas pode ser estimada de várias maneiras. As modernas técnicas de biologia molecular permitem a observação de polimorfismo diretamente na seqüência gênica de organismos. Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e têm sido amplamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética. Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis atualmente, destacam-se as seqüências simples repetidas (SSR) e repetições entre seqüências simples (ISSR). Com o objetivo de avaliar o nível de diversidade genética de populações de *Aechmea fulgens* (Brongn.) provenientes de três fragmentos distintos da mata atlântica de Pernambuco, foram utilizados marcadores SSR e ISSR. Um total de 12 pares de oligonucleotídeos de microsatélites, desenvolvidos para bromeliáceas dos gêneros *Tillandsia*, *Guzmania* e *Pitcairnia* foram testados. Desse total apenas cinco pares apresentaram polimorfismo demonstrando a transferência desses primers para o gênero *Aechmea*. Adicionalmente, 20 oligonucleotídeos ISSR foram utilizados para amplificar as amostras de *A. fulgens*, tendo sido selecionados oito *primers* por apresentarem polimorfismo mais consistente. Os resultados das análises de variância revelaram que a maior divergência esteve presente dentro das populações do que entre elas. Os resultados sugerem que os dois tipos de marcadores são adequados para a avaliação da variabilidade genética, colaborando para o sucesso de futuros estudos e programas de conservação dessa espécie.

Palavras-chave: Bromeliaceae, diversidade genética, marcadores moleculares, ISSR, SSR.

ABSTRACT

Habitats fragmentation is the greatest cause of biodiversity erosion in tropical forests among the anthropic action. Due to the high degree of fragmentation and the isolation of the remaining Atlantic forest, many populations are being extinguished locally while others are suffering losses of its genetic variability. The Bromeliaceae family has a great variety of tropical ornamental species. Eleven species of the *Aechmea* genus occur in the State of Pernambuco, and although it is of great economic and ecological importance, there has been few studies on its genetic diversity. *Aechmea fulgens* is a native Atlantic forest species, which natural populations may be suffering losses on the genetic variability. Plants genetic diversity may be estimated in many ways. Modern techniques on molecular biology allow observing the polymorphism directly on the organism genic sequence. Molecular markers broaden the horizons on researches for the conservation of species and have been widely used to monitor the genetic variability. Among many molecular markers available, SSR and ISSR are relevant. With the aim of evaluating the degree of genic diversity on *Aechmea fulgens* populations, providing from three different fragments of Atlantic forest in Pernambuco, SSR and ISSR markers were used. Twelve pairs of microsatellites oligonucleotides developed for *Tillandsia*, *Guzmania* and *Pictairnia* bromeliad genera were tested. From these, only five pairs had polymorphism, showing transference of these primers to the *Aechmea* gender. Twenty ISSR oligonucleotides were used to amplify *Aechmea fulgens* sample, from which eight primers that had the most consistent polymorphism. The analysis on variance results revealed greater differences inside populations than among them. The results suggest that both markers may be used for genetic variability evaluation, contributing for the success of future studies and species conservation programs.

Key words: Bromeliads, genetic diversity, molecular markers, SSR, ISSR.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução

As florestas tropicais constituem-se num dos ecossistemas do mundo mais ricos em biodiversidade e também um dos mais ameaçados. O conhecimento de sua biodiversidade é instrumento indispensável para a elaboração de estratégias de conservação (Sales et al., 1998). No Brasil, a Floresta Atlântica que cobria uma grande extensão da parte oriental, e hoje está reduzida à cerca de 7% de sua cobertura original, sofreu e vem sofrendo grande pressão antrópica por estar localizada na região do país que mais se desenvolveu.

Um aspecto que demanda atenção sobre a Floresta Atlântica é seu atual estado de fragmentação. Este fato constitui uma das maiores ameaças à biodiversidade, uma vez que conduz a perda qualitativa de espécies (Morellato e Leitão Filho, 1995). Algumas áreas de endemismo como Pernambuco, possuem menos de 5% de sua floresta original (Tabarelli et al., 2005). As florestas remanescentes foram reduzidas a vários fragmentos florestais muito pequenos e bastante separados entre si. A fragmentação das florestas na região Nordeste do Brasil foi mais intensa nos últimos 50 anos (Uchoa Neto e Tabarelli, 2002). Um dos processos que levou à fragmentação foi o cultivo extensivo de cana-de-açúcar, resultando em fragmentos de diversos tamanhos e formas (Câmara, 1991).

Devido a esse alto grau de fragmentação e ao isolamento dos remanescentes atuais da Floresta Atlântica, várias populações estão se extinguindo localmente e outras sofrendo perda de sua variabilidade genética com o isolamento de suas populações (Siqueira Filho & Leme, 2000). Hoje sua fauna e flora estão bastante reduzidas e ainda pouco estudadas (Leme, 1998). A maior parte das espécies brasileiras, em vias de extinção, é endêmica desse ecossistema (Schaffer & Prochnow, 2002), dentre elas estão algumas espécies de bromélias.

Estima-se que a família Bromeliaceae possua mais de três mil espécies (Leme, 1998). Várias espécies desta família são utilizadas como plantas ornamentais em todo o mundo, incluindo as dos gêneros *Aechmea* (Sousa, 1996). O valor ornamental e a falta de produção comercial destas espécies levam a uma agressão às florestas nativas, de onde são coletadas em grandes quantidades para serem comercializadas no mercado interno e externo (Andrade e Demattê, 1999). Neste contexto, a espécie *Aechmea fulgens* Brongn. merece destaque como planta de valor econômico pelo seu potencial ornamental. Pelo menos 40% das espécies de bromélias pode ser encontrado no Brasil, o que representa um contingente

significativo e faz do país o mais importante em termos de diversidade. Em Pernambuco, o gênero *Aechmea* apresenta significativa representatividade onde ocorrem onze espécies distribuídas nos diferentes ambientes do Estado (Sousa e Wanderley, 2000; Leme & Siqueira Filho, 2001).

A diversidade genética dos sistemas e sua taxa de mutação ao longo da evolução, podem ser avaliadas através de indicadores biológicos representados por espécies de animais e plantas (Meffe, 1997). A estratégia mundial para a conservação da natureza, prevê a preservação da diversidade genética, animal e vegetal, como fator fundamental para o desenvolvimento sustentável e manutenção da biodiversidade (Corson, 1996).

Para o estudo de populações naturais de espécies nativas torna-se necessário o conhecimento da diversidade entre populações, fluxo gênico e outros parâmetros genéticos (Zucchi, 2002). Dentre os diversos tipos de marcadores atualmente disponíveis, os marcadores ISSR apresentam a vantagem de amplificar o DNA aleatoriamente, permitindo alta adstringência em temperaturas mais altas, devido ao longo comprimento dos primers. Essas temperaturas altas, aparentemente, proporcionam uma maior reprodutibilidade em relação ao RAPD, por exemplo (Camacho & Liston, 2001). Marcadores microssatélites (SSR) têm sido muito utilizados nos estudos de populações naturais, por apresentarem grande vantagem devido à codominância e por serem altamente polimórficos e multialélicos (Zucchi, 2002).

As investigações sobre as conseqüências genéticas da fragmentação tem enfocado principalmente a redução no tamanho e o aumento do isolamento espacial dos remanescentes florestais (Conte, 2004). A maioria desses trabalhos tem apontado perdas de diversidade, aumento nos níveis de endogamia e alterações na estrutura genética das populações. Entretanto, evidências a partir de estudos com espécies temperadas e subtropicais sugerem que nem todos os eventos de fragmentação levam a perdas genéticas. Em alguns casos, a fragmentação pode até aumentar o fluxo gênico entre populações remanescentes quebrando a estrutura genética local (Ballal et al., 1994).

Considerando a escassez de informações relativas às conseqüências genéticas da fragmentação e ao conhecimento da estrutura genética em populações naturais de espécies ornamentais, o objetivo desse trabalho foi estudar o nível de diversidade genética molecular da espécie *Aechmea fulgens* Brongn. em três

diferentes fragmentos da floresta atlântica de Pernambuco, gerando informações úteis para sua conservação.

2. Revisão de Literatura

2.1. Mata Atlântica: caracterização, problemas e diversidade.

O conceito de Floresta Atlântica tem variado bastante através dos tempos, muitas vezes, atrelado a sua expansão territorial, sendo portanto denominada “Mata Costeira”, “Mata Atlântica”, “Província Atlântica” ou “Floresta Pluvial” por diversos autores. De acordo com Andrade-Lima (1966) a floresta Atlântica pode ser compreendida como uma floresta perenifólia, latifoliada, e higrófila costeira. Trata-se de uma floresta sempre-verde, geralmente com folhas largas, com bastante umidade durante todo o ano e que é vizinha à costa ou acompanha a costa atlântica, e que desta vizinhança decorre a umidade, aliada às altas temperaturas e que garante o caráter da vegetação perenifólia.

A Mata Atlântica reúne formações vegetais diversificadas e heterogêneas. Há três tipos de floresta diferentes em sua composição e aspectos florísticos, mas que guardam, entretanto, aspectos comuns: as Ombrofilas Densas, com ocorrência ao longo da costa; Semidecíduas e Decíduas, pelo interior do Nordeste, Sudeste, Sul e partes do Centro-Oeste; as Ombrofilas Mistas (pinheirais) do Sul do Brasil (Schaffer & Prochnow, 2002). Remanescentes deste Bioma estão associados a ecossistemas que incluem, os manguezais, as restingas, os campos de altitude, e os brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste (Capobianco, 2002).

Originalmente, a segunda maior floresta tropical úmida do Brasil cobria 15% do território brasileiro e atualmente esta reduzida à cerca de 7% de sua cobertura florestal original. Abrangia, total ou parcialmente, 17 Estados situados ao longo da costa atlântica, do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte, além de parte dos Estados de Mato Grosso do Sul e Goiás. Atualmente este Bioma sobrevive em menos de 95 mil Km². Seus principais remanescentes concentram-se nas regiões Sul e Sudeste, recobrando parte da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira, onde o processo de ocupação foi dificultado pelo relevo acidentado e pouca infra-estrutura de transporte. Estes remanescentes não se distribuem uniformemente por todos os ecossistemas do bioma, estando a maior parte localizada em Unidades de Conservação ou sob pressão da atividade rural ou da expansão urbana (Capobianco, 2001).

A Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro inclui todas as florestas localizadas ao norte do Rio São Francisco. O grau de degradação dessas áreas é ainda maior do que o observado em outras regiões do Brasil (Silva & Tabarelli 2000). Esses remanescentes somam apenas 2% da área original da floresta e em sua maioria estão restritos a áreas privadas (Ranta et al., 1998). Atualmente, esses sítios são amplamente circundados por áreas agrícolas e com forte impacto sobre as condições originais da biota. Segundo Ranta et al. (1998), os fragmentos são de pequeno tamanho, onde 48% deles apresentam menos de 10 hectares e apenas 7% acima de 100 hectares.

A fragmentação da paisagem tem sido um dos aspectos mais marcantes da alteração ambiental causada pelo homem. A modificação dos habitats tornou-se uma das principais causas da extinção de espécies e conseqüente perda da biodiversidade. A Mata Atlântica apresenta níveis de desmatamento e fragmentação que comprometem a efetiva conservação da biodiversidade neste ecossistema. No passado, muitas matas ciliares, ao longo de rios, lagos e nascentes, foram desmatadas e indevidamente utilizadas. As conseqüências desta destruição são sentidas diariamente com o agravamento das secas e também das enchentes, o que torna necessária uma urgente ação de recuperação (Schaffer & Prochnow, 2002).

A Mata Atlântica e seus ecossistemas associados figuram entre as mais ricas – em termos de biodiversidade – e mais ameaçadas regiões ecológicas do planeta. A riqueza biológica deve-se a grande variabilidade, intra e interespecífica, existente nessa Floresta. De acordo com estudos realizados pela Fundação SOS Mata Atlântica (1998), em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) e o Instituto Socioambiental, estima-se que, apenas para o grupo das Angiospermas, o Brasil possua entre 55.000 e 60.000 espécies, ou seja, de 22 a 24% do total estimado do planeta. Desse total, acredita-se que a Mata Atlântica possua cerca de 20.000 espécies, ou seja, 33 a 36% das existentes no País. Pavan-Fruehauf (2000) destaca como um dos aspectos fisionômicos expressivos da Floresta Atlântica, a grande riqueza de espécies epífitas, sendo o Sudeste brasileiro o maior centro de diversidade de bromélias, as quais são abundantes, tanto na floresta úmida quanto na restinga.

Soma-se a alta diversidade, o fato de que pelo menos 50% das plantas vasculares conhecidas deste ecossistema são endêmicas. Quando se separam as espécies da flora por grupos, o endemismo cresce significativamente atingindo 53% para as espécies arbóreas, 64% para as palmeiras e 74,4% para as bromélias. Em

suma, apesar de sua história de devastação, a Floresta Atlântica ainda possui remanescentes florestais de extrema beleza e importância que contribuem para que o Brasil seja considerado o país de maior diversidade biológica do planeta. Esses remanescentes representam o último reduto de uma biodiversidade específica, cuja destruição significa que espécies endêmicas, aquelas que só são encontradas nesse ecossistema e em nenhum outro lugar do planeta, correm o risco de desaparecer para sempre (Pádua & Pádua, 2002).

2.2. A Mata Atlântica no Nordeste

A Mata Atlântica é uma das 25 prioridades mundiais de biodiversidade e, apesar de ter sido bastante destruída ao longo dos anos, ela ainda abriga mais de 8000 espécies endêmicas entre plantas e animais (Tabarelli et al., 2005). A história dessa floresta tem sido marcada por períodos de conexão com outras florestas sul-americanas seguidos por períodos de isolamento que levaram a especiação geográfica (Silva et al., 2004). Em consequência disso, a biota florestal é composta por espécies antigas e novas, e várias áreas de endemismo, definidas por estas espécies, têm sido identificadas (Tabarelli et al., 2005). De acordo com Silva et al. (2004), pelo menos cinco áreas de endemismo podem ser reconhecidas com base na distribuição de plantas e vertebrados terrestres: Brejos Nordestinos, Pernambuco, Bahia Central, Costa da Bahia e Serra do Mar. O centro de endemismo Pernambuco, a exemplo de outras áreas, possui menos de 5% de sua floresta original (SOS Mata Atlântica, 1998), distribuídos em dezenas de milhares de pequenos fragmentos florestais (Silva & Tabarelli, 2000).

A floresta úmida costeira do Nordeste, considerada o segundo setor mais ameaçado da mata atlântica brasileira, tem 3.197,62 Km², incluindo os mangues e restingas, o que equivale a 5% da área de distribuição original. Segundo Silva e Tabarelli (2000), cerca de 49% das árvores e arbustos desse trecho de mata que se estende acima do Rio São Francisco, podem se extinguir em função da falta de dispersores de sementes.

Exemplos desses fragmentos florestais podem ser encontrados na Estação Ecológica de Tapacurá, em São Lourenço da Mata, no Refúgio Ecológico Charles

Darwin, em Igarassu, e na Mata do Estado no Município de São Vicente Férrer, em Pernambuco (Anexo 1).

O Refúgio Ecológico Charles Darwin, localiza-se no município de Igarassu, litoral Norte do Estado de Pernambuco. Deve-se considerar que as áreas florestais do Município de Igarassu vêm sendo bastante degradadas, ao longo dos anos, com o desmatamento para fins agropecuários, o que acontece com as áreas em torno do Refúgio. Contudo, os 60ha da área de estudo estão em processo de recomposição, devido a medidas conservacionistas (Santiago e Barros, 2003).

Situada no Município de São Lourenço da Mata, ocupando uma área de 776 hectares, a Estação Ecológica do Tapacurá destina-se a pesquisas na área de Botânica, Zoologia e Ecologia. O trabalho realizado tem como objetivo desenvolver hábitos de conservação de recursos florestais e da fauna da Mata Atlântica.

Outro setor da Mata Atlântica bastante ameaçado são os brejos de altitude. Nessa região encontra-se a Mata do Estado, abrangendo aproximadamente 600 ha, sendo subdividida em três Matas denominadas pela população local de: Caidor, Pimenta e do Brejinho. Está situada no município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte no Estado de Pernambuco (Sales et al., 1998).

2.3. Conseqüências genéticas da fragmentação

De acordo com Heywood & Iriondo (2003), nos últimos 50 anos a escala e intensidade das relações antrópicas com o ambiente tem revelado uma vasta perda de hábitat, degradação e fragmentação, com subsequente perda de espécies e da variabilidade genética. A fragmentação de hábitats como os da Floresta Atlântica constitui atualmente uma realidade insuperável e representa a maior causa da erosão da biodiversidade (Siqueira Filho, 2001). A compreensão dos seus efeitos sobre a biodiversidade constitui um item fundamental para o sucesso de programas de conservação florestal (Tabarelli et al., 1999).

A fragmentação florestal provoca a diminuição do número de indivíduos de uma população favorecendo a perda de variação genética. As principais conseqüências da fragmentação e redução populacional são deriva genética, aumento da endogamia e diminuição do fluxo gênico (Hoffmeister et al., 2005; Galeuchet et al., 2005). Em adição, a fragmentação generalizada da Floresta

Atlântica limita a migração e a colonização de espécies, necessárias para a persistência das populações em longo prazo (Tabarelli et al., 2005).

Os poucos exemplos de quantificação da perda da diversidade genética pela fragmentação se referem a espécies arbóreas e herbáceas de clima temperado, com poucos casos estudados de espécies epífitas tropicais.

Kageiama et al. (1998) conduziram um estudo na Floresta Atlântica Tropical onde avaliaram o efeito da fragmentação e perturbação antrópica, em populações das espécies arbóreas *Cedrella fissilis* e *Chorisia speciosa* utilizando eletroforese de isoenzimas. Os resultados mostraram várias mudanças significativas para suas populações.

Os efeitos da fragmentação sobre a estrutura genética de populações de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae) foram estudados por Souza et al. (2004). Os autores estudaram, por meio de oito locos isoenzimáticos, populações naturais situadas em diferentes fragmentos florestais na região de Bauru, São Paulo. Segundo os autores a consequência genética da fragmentação ficou evidenciada pela perda de alelos raros, fixação de alelos e oscilações aleatórias das frequências alélicas nas populações. Estes resultados, somado ao alto nível de divergência genética entre as populações, sugerem a ocorrência de deriva genética devido à redução no tamanho das populações.

2.4. A família Bromeliaceae

Pertencente a classe das Monocotiledôneas, a família Bromeliaceae é um dos grupos vegetais mais importantes para a manutenção da biodiversidade das florestas neotropicais sendo considerada, entre as epífitas da Floresta Atlântica, uma das mais visitadas por pássaros, servindo de abrigo e alimentação também para outras espécies (Pizo, 1994; Siqueira Filho, 2001). Esta família está dividida em três subfamílias: Pticaírioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Cronquist, 1988), compreendendo cerca de 54 gêneros e mais de 3000 espécies (Leme, 1998). A subfamília Bromelioideae apresenta grande diversidade estrutural e genética (Benzing, 1994), porém poucos estudos têm sido realizados para melhor conhecimento dessas bromélias tipicamente brasileiras.

Está presente em todo o território brasileiro, desde a caatinga aos campos de altitude, passando pelos campos rupestres, Floresta Amazônica, restinga e, especialmente, na Floresta Atlântica (Cotias-de-Oliveira et al., 2000). Várias

espécies desta família apresentam grande valor econômico como o “abacaxi” (*Ananas comosus* (L.)Murril), o “caroá” (*Neoglaziovia variegata* (Arruda)Mez), produtora de fibras e as ornamentais, especialmente as dos gêneros *Aechmea*, *Billbergia*, *Canistrum* e *Cryptanthus* (Sousa & Wanderley, 2000). Neste contexto, a espécie *Aechmea fulgens* Brongn. merece destaque como planta de valor econômico pelo seu potencial ornamental. As características que explicam o interesse por essas plantas são o exotismo, a beleza, e a durabilidade. Suas inflorescências têm despertado interesse como na utilização como flor de corte (Terao et al., 2005).

Em termos ecológicos, as bromélias desempenham importante papel no ciclo de vida de vários animais que dependem de seus reservatórios, chamados de fitotelmas, para sua sobrevivência e reprodução. Por abrigar larvas de insetos vetores de algumas doenças humanas, como no caso dos mosquitos transmissores da malária e da dengue, as plantas dessa família têm sido por vezes eliminadas de algumas regiões (Siqueira Filho, 1998).

Três centros de diversidade são aceitos para a família: o norte dos Andes, desde o México às Antilhas, o Planalto das Guianas e o leste do Brasil (Cavallari, 2004). A Mata Atlântica, ao longo da costa leste brasileira, merece destaque por apresentar espécies com alto grau de endemismo (Leme & Marigo, 1993).

2.4.1. O gênero *Aechmea*

Aechmea Ruiz & Pav. é o maior e mais complexo gênero de bromélias. Erva, terrestre, epífita ou rupícola, pertence a subfamília Bromelioideae e reúne cerca de 172 espécies apresentando-se largamente distribuídas na natureza desde o México, até a Argentina. Apesar de sua grande importância para as florestas tropicais, pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva da família Bromeliaceae (Martinelli, 1997). Algumas espécies dessa família apresentam mecanismos que favorecem a alogamia, porém a maioria é autocompatível. Sendo esse processo associado freqüentemente a polinização por vertebrados (Benzing, 1994; Martinelli, 1997). Em Floresta Atlântica as bromeliáceas congregam cerca de 30% dos recursos alimentares usados por beija-flores e morcegos (Sazima et al., 1999).

Em Pernambuco ocorrem onze espécies deste gênero distribuídas nos diferentes ambientes do Estado. Estas espécies apresentam quatro padrões de distribuição com características distintas em relação ao país, sendo: (1) Espécies

com ampla distribuição (*A. lingulata* Baker e *A. mertensii* Schult); (2) distribuição do nordeste ao sudeste (*A. fulgens* Brong e *A. equilega* Salisb); (3) exclusivas do nordeste (*A. eurycorymbus* Harms e *A. mulfordii* L. B. Sm, *A. stelligera* L. B. Sm e *A. tomentosa* Mez) e (4) apenas no Estado de Pernambuco (*A. muricata* L. B. Sm e *A. werdemannii* Harms) (Sousa & Wanderley, 2000) e *A. gustavoi* J.A. Siqueira & Leme (Leme & Siqueira Filho, 2001).

2.4.2. *Aechmea fulgens* Brongn.

O nome da espécie vem do grego, *aichmé*, que significa ponta de lança e *fulgens* que significa brilhante. Esta espécie apresenta uma grande espiga, com flores violetas contidas em brácteas de um vermelho-alaranjado-vivo. *Aechmea fulgens* está distribuída pelos Estados de Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro, ocorrendo como epífita e terrestre nas matas ou restingas. Em Pernambuco, sua floração ocorre nos meses de janeiro a abril e a frutificação de maio a julho (Sousa & Wanderley, 2000). De acordo com Smith & Downs (1979), *A. fulgens* apresenta duas variedades: *A. fulgens* var. *fulgens* com folhas completamente verdes e *A. fulgens* var. *discolor* com folhas verde-púrpuras na face abaxial (Anexo 2).

2.4.3. Descrição Botânica

Planta com cerca de 30,0 – 80,0 cm de altura. Folhas verdes, 16,0 – 63 cm de comprimento, 2,6-6,3 cm de largura, revestidas por escamas castanhas, esparsas na lâmina, densamente dispostas na bainha, ápice acuminado, margens inaparentemente serradas, espinhos esparsos, até 0,5 mm de comprimento; bainha oval, mais clara que a lâmina, 12,0-16,0 cm de comprimento, 4,0-9,5 cm de largura. Escapo ereto, glabro, vináceo, 11,0-37,0 cm de comprimento. Brácteas do escapo membranáceas, vináceas, lanceoladas, 5,0-12,0 cm de comprimento. Inflorescência simples, espiciforme, raros ramos basais, com 4-6 flores laxamente dispostas, 10,0-28,0 cm comprimento, 2,5-8,0 cm de largura na base, raque vermelho. Brácteas florais ausente. Flores sésses, 1,8-2,0 cm de comprimento. Sépalas livres, fortemente assimétricas, vermelhas com ápice lilás, obtusas, base crassa, 3,5-4,0 mm de comprimento. Pétalas livres, lilases, 1,0-1,3 cm comprimento, com margens mais claras. Fruto baga, vináceo, 1,2 cm comprimento, 5,0 mm largura. Sementes obvoídes, 1,5 mm comprimento, 0,5 mm largura (Sousa, 1996).

2.5. Estrutura genética de populações

Estrutura genética é definida como a distribuição não aleatória de alelos e genótipos dentro de populações de espécies (Hamrick, 1983).

O estudo da variação genética em populações naturais de uma espécie considera basicamente a quantificação dentro dos níveis de variabilidade das populações e a caracterização da estrutura genética entre populações (Conte, 2004). A preservação da diversidade genética se tornou objetivo da maioria dos programas de conservação e conhecer a distribuição desta diversidade dentro e entre populações naturais é o primeiro passo (Cavallari, 2004). O conhecimento do modo como a variação genética de uma espécie está distribuída em suas populações é essencial para a sua conservação (Reis, 1999), como também, de acordo com Lacerda et al. (2001), para o estabelecimento de formas de exploração econômica.

O estudo da estrutura genética de populações, aliado a outras áreas da biologia, pode fornecer valiosas informações para o planejamento e execução de programas de conservação de uma espécie (Cavallari, 2004). Um exemplo disto pode ser dado pela pesquisa de Jones et al. (2001), com uma espécie de Liliaceae nativa da Grã-Bretanha. Após as análises de seus resultados, os autores concluíram que as populações devem ser mantidas isoladas, pois cruzamentos artificiais entre plantas de diferentes populações, neste caso, destruiriam a variabilidade inter-populacional, bem como as adaptações locais.

De acordo com Loveless & Hamrick, (1984), os fatores que afetam a reprodução e o fluxo gênico são determinantes na estruturação genética de populações. Por exemplo, polinizadores como morcegos e beija-flores devido à sua capacidade de vôo, promovem o aumento da variabilidade dentro de populações, enquanto diminuem a divergência entre ao mantê-las ligadas por fluxo gênico.

2.6. Técnicas moleculares para o estudo da variabilidade genética em plantas.

A diversidade genética em plantas pode ser estimada de várias maneiras. O mais simples indicador de variabilidade genética é a própria variabilidade morfológica. As características morfológicas, porém, podem ser influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade. Portanto, faz-se

necessário a utilização de características não influenciáveis pelo ambiente. As modernas técnicas de biologia molecular permitem a observação de polimorfismo diretamente na seqüência gênica de organismos. Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e têm sido amplamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Zucchi, 2002). Podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética (Pinto 2001) e ainda distinguir, em alguns casos, homocigotos e heterocigotos (Hodgkin et al., 2001).

Os primeiros marcadores moleculares foram desenvolvidos no início dos anos 60 com a introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas. Esta técnica detecta de forma indireta polimorfismo em seqüências de DNA e se baseia na detecção de polimorfismo na carga elétrica de proteínas com função enzimática, gerado por mutações na seqüência gênica. Outra técnica, surgida posteriormente, baseia-se na ação de enzimas de restrição as quais reconhecem uma seqüência de DNA e clivam a molécula nesses sítios específicos. Mutações, deleções, ou inserções nos sítios de clivagem são detectados como polimorfismos no tamanho do fragmento de DNA após a digestão com uma enzima de restrição. Esse marcador chamado de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) surgiu da década de 70 e se tornou uma ferramenta importante para várias áreas da biologia. Porém por ser muito laboriosa essa técnica não tem sido muito utilizada em trabalhos de genética de população (Zucchi, 2002).. Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) da década de 80, surgiram diversas técnicas que permitem detectar o polimorfismo diretamente em moléculas de DNA (Cavallari, 2004). Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis atualmente, destacam-se – em estudos de diversidade de plantas – as seqüências simples repetidas (SSR) e repetições entre seqüências simples (ISSR).

Como consequência da característica dominante, não é possível estimar a freqüência gênica ou alélica. O número de alelos por loco, a heterocigosidade observada e esperada têm sido os parâmetros genéticos mais utilizados para quantificar variabilidade genética em populações de plantas. Desse modo, as principais abordagens para a caracterização da estrutura genética de populações, isto é, as estatísticas F de Wright, análise da diversidade gênica de Nei (1973) e os coeficientes de coancestralidade de Cockerham, só podem ser realizadas com o uso de marcadores codominantes (Cavallari, 2004). Para analisar marcadores

dominantes, Excoffier et al. (1992) pela introdução da estatística ϕ proporcionaram uma nova alternativa para esses tipos de marcadores (Robinson, 1998). Essa Análise de Variância Molecular, denominada AMOVA, produz estimativas dos componentes de variância das análogas estatísticas F , chamadas de estatísticas ϕ , que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica (Zucchi, 2002).

Outras abordagens podem ser adotadas para a mensuração da diversidade genética total de uma espécie ou população, que são indiferentes à característica dominante dos marcadores de alguns marcadores. A percentagem de bandas polimórficas foi utilizada por vários autores para medir a diversidade genética em populações de plantas (Ge et al., 1999; Cavallari, 2004; Barreira, 2005). Outra estratégia para a mensuração da diversidade genética molecular é a utilização do Índice de Diversidade de Shannon (Shannon, 1948) que pode ser utilizado tanto para comparar a diversidade entre espécies como entre populações da mesma espécie (Cavallari, 2004).

2.6.1. Marcadores Microsatélites (SSR)

As seqüências simples repetidas ou microsatélites são um dos marcadores mais polimórficos encontrado no genoma de animais e plantas (Salles et al., 2003) e tem-se mostrado como excelente marcador molecular para o estudo de diversidade genética e filogenia. Isto se deve às suas características de natureza multialélica, herança co-dominante, facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (Pinto, 2001).

SSRs são pequenas seqüências de DNA, constituídas de unidades repetidas de nucleotídeos (1-6 nucleotídeos, em tandem) encontradas em todos os genomas de procariotos e eucariotos. Estão presentes tanto em regiões codificadoras como não codificadoras e são geralmente muito polimórficas devido ao alto nível de variação no número de repetições (Zane et al., 2002). Essas variações decorrem do fato de os microsatélites estarem localizados em regiões que sofrem taxas de mutação muito maiores que nas seqüências de cópia única. Os alelos diferem por apresentarem números distintos de repetições, oriundos de *crossing over* desigual durante a meiose ou do deslizamento da DNA polimerase durante a duplicação da molécula (Pinto, 2001).

Embora as seqüências de microssatélites variem as seqüências adjacentes podem ser únicas e conservadas no mesmo loco entre diferentes indivíduos da mesma espécie. Assim, pode-se desenhar um oligonucleotídeo específico para as seqüências adjacentes a um microssatélite, de forma que, por PCR será possível amplificar esse loco em diferentes genótipos. Como o número de unidades repetidas em tandem em um microssatélite pode ser variável entre diferentes genótipos, os produtos da amplificação dos diferentes indivíduos mostram um polimorfismo do tamanho do fragmento amplificado (Conte, 2004). A função dos microssatélites ainda não está totalmente esclarecida. Estudos indicam que a alternância das repetições entre purinas/pirimidinas, como (GT) n e (GC) n tem potencial para formar a estrutura do DNA-Z e desempenhar um papel na recombinação, regulação gênica ou condensação cromossômica (Lagercrantz et al., 1993).

Os métodos atuais para transformar microssatélites em marcadores moleculares requerem a construção de uma biblioteca genômica, triagem de uma biblioteca para elementos repetitivos, sequenciamento de DNA dos clones positivos, desenho dos primers, seleção dos locos informativos e caracterização da variação alélica (Hayden & Sharp, 2001; Zane et al., 2002).

Cerca de 10% a 20% dos oligonucleotídeos são informativos, tornando SSR uma técnica de elevado custo e intensiva em trabalho. O uso de bibliotecas enriquecidas e do conceito de “*primers* ancorados” tem reduzido os custos de obtenção dos *primers* e facilitado o trabalho envolvido. Entretanto, uma vez obtidos os oligonucleotídeos informativos para uma espécie os custos e a mão-de-obra reduzem drasticamente tornando os ensaios laboratoriais rápidos e a técnica bastante acessível (Buso et al., 2003).

Devido ao alto grau de polimorfismo os microssatélites têm sido empregados em diferentes situações da área vegetal, no entanto seu uso em espécies nativas é limitado devido às escassas informações sobre seqüências de DNA de espécies tropicais. Tais marcadores foram empregados com sucesso na caracterização de acessos e cultivares de bancos de germoplasma e na determinação do grau de parentesco entre indivíduos (Creste et al., 2004; Bianchi et al., 2004a,b; Moretzsohn et al., 2004). Em espécies arbóreas tropicais, os microssatélites foram empregados com sucesso em estudos do sistema reprodutivo, fluxo gênico e da estrutura genética de populações, tais como, *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al., 2003) e *Euterpe edulis* (Conte, 2004).

2.6.2. Marcadores ISSR

A escolha de um marcador molecular depende principalmente de sua reprodutibilidade e simplicidade. Os melhores marcadores para estudos de mapeamento, caracterização molecular ou estudos filogenéticos devem ter baixo custo e serem menos laboriosos. As seqüências internas simples repetidas (ISSR) constituem uma nova classe de marcadores que vêm sendo bastante utilizada nesses estudos (Bornet & Branchard, 2001). A ISSR-PCR é uma técnica simples, rápida, eficiente e possui alta reprodutibilidade. Os produtos amplificados variam de 200-2000 pb e são sensíveis para detecção tanto por eletroforese em gel de agarose como em gel de poliacrilamida (Reddy, 2002).

Essa técnica envolve seqüências de microssatélites como oligonucleotídeos iniciadores em reação de PCR para gerar marcadores multialélicos. Ela combina as vantagens dos microssatélites e AFLP mais a universalidade dos marcadores RAPD. São altamente polimórficos e úteis no estudo de diversidade genética, filogenia, caracterização molecular, mapeamento e biologia evolutiva. Nesse método os microssatélites são utilizados como *primers* para amplificar as regiões internas dos SSR. É baseada em PCR, o qual envolve a amplificação do segmento de DNA presente em uma distância amplificável entre dois microssatélites idênticos, orientados em direções opostas. A técnica usa microssatélites de 16 a 25 pb como um oligonucleotídeo iniciador único. Esses oligos podem anelar em qualquer ponto ou ser ancorados com oligonucleotídeos degenerados que anelam em pontos específicos. O ancoramento dos oligos pode ser na região 5' ou 3', com 1 a 4 bases degeneradas da região flanqueada pelas seqüências SSR. Os marcadores ISSR apresentam alta reprodutibilidade devido ao uso de seqüências longas (16-25 pb) quando comparadas ao RAPD e permite o uso de altas temperaturas de anelamento mostrando alta estrigência (Reddy et al., 2002). A limitação do ISSR, assim como o RAPD, é que a maioria dos fragmentos são de expressão dominante. No entanto, recentes estudos realizados com esses marcadores em populações naturais têm demonstrado sua natureza hipervariável e seu potencial uso em estudos de vários níveis populacionais (Xiao et al., 2004).

Os marcadores ISSR têm várias aplicações em genética de populações, por exemplo, no estudo de fluxo gênico, análise de paternidade ou ainda na identificação de cultivares, onde tem sido empregado com mais freqüência. Além disso, estes marcadores tem sido usados em populações silvestres de plantas para acessar a

estrutura genética de espécies ameaçadas (Hassel & Gunnarsson, 2003; Xiao & Gong, 2006)).

2.7. Estudos de variabilidade genética em plantas por meio de marcadores moleculares.

Recentes avanços na biologia molecular têm provido as ferramentas necessárias para medir a quantidade de variação genética presente nos organismos. Pesquisas sobre a diversidade nucleotídica estão mostrando como os genomas têm sido moldados pela evolução. Essa diversidade reflete a rica história da seleção, migração, recombinação e sistemas de acasalamento. Em adição, a variabilidade genética é a maior fonte da biodiversidade em todos os níveis (Meffe, 1997; Buckler & Thornsberry, 2002).

Dados de seqüenciamento do DNA e estudos de sítios de restrição em DNA de cloroplastos têm revelado grande valor na geração de hipóteses sobre as relações filogenéticas entre as angiospermas (Brown, 2000). A utilização do genoma do cloroplasto deve-se ao tamanho relativamente pequeno de sua seqüência, modo conservativo de evolução e relativa abundância como componente do DNA dos vegetais. Desse modo, segmentos selecionados do genoma de cloroplasto podem fornecer uma gama de informações auxiliando significativamente os estudos evolutivos (Hills *et al.*, 1996).

De acordo com Brown (2000), nos primeiros trabalhos de seqüenciamento de DNA realizados em Bromeliales, por Clark & Clegg (1990), foram utilizadas seqüências do gene de cloroplasto *rbcL*, procedentes de 7 espécies. A informação filogenética contida nesse gene foi muito pouco expressiva, ou seja, *rbcL* se mostrou bastante conservativo, proporcionando resultados equivocados.

Terry *et al.* (1997) desenvolveram um projeto de seqüenciamento de DNA em Bromeliaceae utilizando o gene de cloroplasto *ndhF*. Esse gene contém aproximadamente 2100 nucleotídeos e seu comprimento é 30% maior do que o *rbcL*. Estima-se que o primeiro tenha duas vezes a variabilidade do segundo, ou seja, espera-se que os dados de seqüência de *ndhF* sejam mais úteis para resolver as relações filogenéticas intrafamiliares quando comparados aos dados de *rbcL*. Brown (2000) ressalta que qualquer estudo molecular que aborde as relações entre gêneros e espécies de Bromelioideae precisará fazer uso de seqüências menos

conservativas, ou seja, que forneçam mais informações filogenéticas do que as proporcionadas pelos genes *rbcL* ou *ndhF*.

No entanto para estudos de diversidade genética dentro e entre populações, o uso de seqüências conservadas, como os microssatélites, tem sido aplicadas com êxito em várias espécies vegetais. Devido a sua eficiência e reprodutibilidade, o uso de microssatélites ancorados tem sido aplicado com sucesso para estimar a diversidade genética ao nível inter e intraespecífico em diversas culturas como, arroz, trigo e vigna (Reddy et al., 2002).

Estudos de diversidade genética em Bromeliáceas que façam uso de métodos baseados em PCR são ainda escassos. Chen-HungChi et al. (2002), avaliaram a similaridade genética, com marcaores RAPD, entre dezoito acessos de sete gêneros de Bromeliaceae, sendo seis gêneros de espécies ornamentais – *Cryptanthus*, *Dyckia*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Tillandsia* e *Vriesea*. Os resultados mostraram que 30 marcadores foram úteis para discriminação do gênero e espécies, especialmente para espécies com alta similaridade morfológica.

Trabalhos recentes com espécies ornamentais dessa família, utilizando microssatélites, foram realizados por Boneh et al. (2003) e por Sarthou et al. (2003). Os autores desenvolveram microssatélites para as espécies *Tillandsia fasciculata* e *Guzmania monostachya* coletadas na Costa Rica e *Pitcairnia geyskesii*, espécie endêmica do Suriname e Guiana Francesa, respectivamente. O nível de polimorfismo gerado pelos microssatélites nos dois trabalhos foi útil no estudo e comparação da estrutura genética de populações fragmentadas dessas espécies.

O uso de marcadores microssatélites tem sido freqüente no estudo da estrutura e polimorfismo genético em populações de várias espécies vegetais, tais como, *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 2001), *Malpighia emarginata* (Salla, 2002), espécies arbóreas (Kageyama et al., 2003) e *Cucumis* (Ritschel et al., 2004).

Muro-Abad et al. (2005) avaliaram a diversidade genética entre 40 genitores de *Eucalyptus spp.* por meio de marcadores RAPD e microssatélites. Comparados ao RAPD, os microssatélites se mostraram mais eficientes na discriminação de genitores de *E. grandis* e *E. urophylla*. Estes marcadores também foram usados por Galeuchet et al. (2005) no estudo da variação genética de 28 populações fragmentadas de *Lychnis flos-cuculi* L... Os autores avaliaram sete *loci* polimórficos de microssatélites. Os resultados indicaram baixa diferenciação genética entre as populações sugerindo que os efeitos da fragmentação não foram muito pronunciados sobre essas populações.

A exemplo dos microssatélites os marcadores ISSR tem tido, atualmente, grande aplicabilidade em estudos genéticos. Culturas de maior importância econômica têm sido avaliadas com esses marcadores em relação à variabilidade genética de acessos e espécies silvestres visando resultados que auxiliem em programas de melhoramento para estas espécies.

Camacho & Liston (2001) utilizaram marcadores ISSR para acessar a variabilidade genética de populações naturais de *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae). Dos vinte e dois oligonucleotídeos utilizados, seis produziram marcadores úteis para separar potenciais clones entre os genótipos avaliados.

Seqüências internas simples repetidas foram utilizadas por Escandón et al. (2005) para avaliar acessos de *Jacaranda mimosifolia* L. Don., espécie ornamental nativa da América do Sul e Caribe. Os autores examinaram 21 genótipos provenientes de diferentes locais da Argentina. Os resultados mostraram que os quatro oligonucleotídeos empregados foram úteis em separar os 21 genótipos e apenas um grupo com alta similaridade foi definido.

Xiao et al. (2004) realizaram um estudo para o conhecimento da variação genética em populações silvestres de *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae), espécie endêmica do sudeste da China. Eles utilizaram marcadores ISSR para acessar a variação genética dentro e entre 12 populações dessa espécie. Os 11 oligonucleotídeos selecionados para a análise produziram um total de 78 fragmentos. Como resultado os autores observaram baixa diversidade genética tanto ao nível de população quanto de espécie.

Marcadores ISSR foram empregados por Awasthi et al. (2004) no estudo da diversidade genética de espécies domesticadas e silvestres do gênero *Morus*, conhecidas como “mulberry”. Para a análise com ISSR foram utilizados seis oligonucleotídeos ancorados, quatro geraram 93 marcadores polimórficos.

Nan et al. (2003) utilizaram 14 oligonucleotídeos ISSR para avaliar a diversidade genética em 60 indivíduos de *Primula obnica* (Primulaceae), espécie ornamental do sudeste da China. Os autores avaliaram quatro populações naturais e um material cultivado. As análises de ISSR revelaram uma média de 20 fragmentos polimórficos por primer, com tamanhos variando de 300-2200 pb. Os resultados do agrupamento permitiram observar que houve diferenciação genética entre as populações estudadas.

Culturas como arroz (Nagaraju et al., 2002), algodão (Liu & Wendel, 2001) e trigo (Mondini et al., 2005) também foram estudadas por meio de marcadores ISSR.

Referências

ANDRADE-LIMA, D. **Bromeliaceae de Pernambuco**. Recife: Publicações da Secretaria de Cultura, Pesquisas Agronômicas – IPA, 1966. 376 p.

ANDRADE, F. S. A.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Estudos sobre produção e comercialização de Bromélias nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, Campinas, v. 5, n. 2, p. 93-161, 1999.

AWASTHI, A.K.; NAGARAJA, G.M.; NAIK, G.V.; KANGINAKUDRU, S.; THANGAVELU, K.; NAGARAJU, J. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. BMC Genetics, v. 5, n.1, p. 1-9, 2004.

BALLAL, R.S.; FORÉ, S.A.; GUITTMAN, S.L. Apparent gene flow and genetic structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. Canadian journal of Botany, v.72, p.1311-1315. 1994.

BARREIRA, S. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLelsh como base para o manejo florestal**. 2005. 61p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BENZING, D.H. How much is known about Bromeliaceae in 1994?. Selbyana. v.15, n.1, p.1-7, 1994.

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

BIANCHI, V.J., SANSVINI, S., FACHINELLO, J.C. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. Rootstocks. Scientia Agricola, v. 61, n.3, p. 303-306, 2004.

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

BROWN, G.K. Dados moleculares em Bromeliaceae. In: LEME, E.M.C. **Nidularium – Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: GMT Editores. 2000. 264p.

BUCKLER, IV.E.S. & THORNSBERRY, J.M. Plant molecular diversity and applications to genomics. Current Opinion in Plant Biology, v.5, p.107-111, 2002.

BUSO, G.S.C., CIAMPI, A.Y., MORETZSOHN, M.C., AMARAL, Z.P.S. E BRONDANI, R.V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. Biotecnologia & Desenvolvimento, n.30, p.46-50, 2003.

CÂMARA, I. DE G. Plano de ação para a Mata Atlântica. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo. 1991.

CAMACHO, J.F. AND LISTON, A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *American Journal of Botany*, v. 88, n. 6, p.1065-1070, 2001.

CAPOBIANCO, J.P.R. (Organizador) **Dossiê Mata Atlântica 2001. Projeto Monitoramento Participativo da Mata Atlântica**. Brasília: Instituto Socioambiental, 2001. Disponível: <www.socioambiental.org/website/dossie/doc.htm> Acesso em: 15 jul, 2005.

CAPOBIANCO, J.P.R. Mata Atlântica: Conceito, abrangência e área original. In: SCHAFFER, W.B.; PROCHNOW, M. **A Mata Atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira**. Brasília; APREMAVI. 2002. p.111-123.

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

CHEN, HC; SHII, CT; LIN, SF; CHIU, HL; CHUNG, JP. Genetic relationship between ornamental bromeliads of Centric South America and commercial cultivars in Taiwan. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, v.48, n.3, p.201-210, 2002.

CLARK, W.D. & CLEGG, M.T. Phylogenetics comparisons among rbcL sequences in the Bromeliaceae. (Abstract). *American Journal of Botany*, v.77, n.115, 1990.

COLLEVATTI, R.G., GRATTAPAGLIA, D., HAY, J.D. Population Genetic Structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, base of on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, v.10, p.349-356, 2001.

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

CORSON, W. H. **Manual Global de Ecologia: O que você pode fazer a respeito da crise do meio ambiente**. 2ª ed. São Paulo: Augustus, 1996.

COTIAS-DE-OLIVEIRA, A.L.P.; ASSIS, J.G.A.; BELLINTANI, M.C. ANDRADE, J.C.S.; GUEDES, M.L.S. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genetic and Molecular Biology*, v.23, n.1, p. 173-177, 2000.

CRESTE, S., TULMAN NETO, A., VENCOSKY, R., SILVA, S.O. E FIGUEIRA, A. Genetic diversity of *Musa* diploid and triploid accessions from the Brazilian Banana Breeding Program estimated by microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51(7): 723-733, 2004.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2a. ed. New York: **New York Botanic Garden**. 1988. 555p.

ESCANDÓN, A.S.; PÉREZ DE LA TORRE, M.; ACEVEDO, A.; MARCUCCI-POLTRI, S.; MIYAJIMA, I. Anchored ISSR as molecular marker to characterize accessions of *Jacaranda mimosifolia* L. Don. *Acta Horticulture*, n.683, p.121-125, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSES, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v.131, p.479-491, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a. Ed. Brasília: CNARGEM-EMBRAPA, 1998, 220p.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA ESPACIAIS E INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995**. São Paulo, 1998, 48p.

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

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M. et al. **Genetic and Conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1983. p.335-348.

HASSEL, K. AND GUNNARSSON, U. The use of inter simple sequence repeat (ISSR) in bryophyte population studies. *Lindbergia*, n.28, p. 152-157, 2003.

HAYDEN, M.J. AND SHARP, P.J. Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers. *Nucleic Acids Research*, v.29, n.8, p. 2-8, 2001.

HEYWOOD, V.H.; IRIONDO, J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, 113: 321-335, 2003.

HODKIN, T.; ROVIGLIONI, R.; DE VICENTE, M.C.; DUDNIK, N. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. *Acta Horticulture*, v.546, p.107-118, 2001.

HOFFMEISTER, T.S.; VET, L.E.M; BIÈRE, A.; HOLSINGER, K.; FILSER, J. Ecological and Evolutionary Consequences of Biological Invasion and Habitat Fragmentation. *Ecosystems*, n.8, p.657-667, 2005.

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

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA L.M.I. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF*, v.12, n.32, p.65-70, 1998.

KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L..A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIN, M.B.; VENCOVSKY. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Florestalis*, 64: 93-107, 2003.

KARASAWA, M.M.G. **Análise da estrutura genética de populações e sistema reprodutivo de *Oryza glumaepatula* por meio de microssatélites**. 2005. 91p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P. LEMOS-FILHO, J.P. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosaceae) a tropical tree from Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, v.10, p.1143-1152, 2001.

LEME, E.M.C.; MARIGO, L.C. **Bromélias na Natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual Ltda, 1993. 183p.

LEME, E.M.C. **Canistrum: Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra Consultoria Editorial, 1998. 107pp.

LEME, E.M.C.; SIQUEIRA FILHO, J.A. Studies in Bromeliaceae of Northeastern Brazil. *Selbyana*, 22 (2): 146-154, 2001.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, v.1, p. 205-208, 2001.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, n.15, p.65-95. 1984.

MARTINELLI, G. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H.C. & Guedes-Bruni, R.R. (eds). Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997, p.213-250.

MEFFE, G.K. **Principles of Conservation Biology**. 2a.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. USA. 1997. 495 p.

MONDINI, L., PAGNOTTA, M.A., GRAUSGRUBER, H., PORCEDDU, E. Assessment of genetic diversity of european emmer wheat populations by EST-SSR, ISSR and SSR molecular markers. In: ITALIAN SOCIETY OF AGRICULTURAL GENETICS ANNUAL CONGRESS, 49., 2005, Potenza, Italy. **Proceedings**. P.12-15.

MORELLATO, P. C.; LEITÃO FILHO, H DE F. (eds). **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra**. Campinas.: Universidade Estadual de Campinas, 1995. 136p.

MORETZSOHN, M.C., HOPKINS, M.S., MITCHELL, S.E., KRESOVICH, S., VALLS, J.F.M. FERREIRA, M.E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, v.4, n.11, p. 1-10, 2004.

MURO-ABAD, J.I.; ROCHA, R.B.; CRUZ, C.D.; ARAÚJO, E.F. Obtainment of Eucalyptus spp. hybrids aided by molecular markers – SSR analysis. *Scientia Florestalis*, n.67, p.53-63, abr, 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-845, 2000.

NAGARAJU, J.; KATHIRVEL, M.; RAMESH KUMAR, R.; SIDDIQ, E.A.; HASNAIN, S.E. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *PNAS*, v.99, n.9, p.5836-5841, 2002.

NAN, P.; SHI, S.; PENG, S.; TIAN, C.; ZHONG, Y. Genetic Diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from Central and South-west China as Reveled by ISSR Markers. *Annals of Botany*, v.91, p.329-333, 2003.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

PÁDUA, S.M. & PÁDUA,, C.V. Por que salvar a natureza? In: SCHAFFER, W.B.; PROCHNOW, M. **A Mata Atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira**. Brasília: APREMAVI. 2002. p.139-143.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas medicinais da Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem**. São Paulo: Annablume: Fapesp, 2000. 216 p.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Isoenzimas e Microssatélites em Plantas. *Biotecnologia & Desenvolvimento*, n.20, p.16-19, 2001.

PIZO, M.A. O uso das bromélias por aves da mata atlântica da Fazenda Intervalles, sudeste do Brasil. *Bromélia*, Rio de Janeiro, v.1, n.4, p.3-7, dez.1994.

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

RANTA, P.; BLOM, T.; NIEMELA, J.; JOENSUU, E.; SIITONEN, M. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodiversity and Conservation*, v. 7, p. 385-403. 1998.

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

RITSCHHEL, P.S.; LINS, T.C.; TRISTAN, R.L.; BUSO, G.S.; BUSO, J,A.; FERREIRA, M,E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Biology*, v.4, n. 9, 2004.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa:UFV, 1998, p. 329-367.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). Revista Brasileira de Fruticultura, v.24, n.1 p.15-22, 2002.

SALES, M. F.; RODAL, M. J.; MAYO, S. J. **Plantas vasculares das Florestas Serranas de Pernambuco**: Um checklist da flora ameaçada dos Brejos de Altitude, Pernambuco, Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1998. 130p.

SALLES, G.; BUSO, C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOLN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Boletim Técnico da EMBRAPA/EPAGRI**, Brasília, DF, n.20, 2003.

SARTHOU, C.; BOISSELIER-DUBAYLE, M. C.; LAMBOURDIÈRE, J.; SAMADI, S. Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. Molecular Ecology Notes, n.3, p.221-223, 2003.

SANTIAGO, A.C.P.; BARROS, I.C.L. Pteridoflora do Refúgio Ecológico Charles Darwin (Igarassu, Pernambuco, Brasil). Acta Botânica Brasileira, São Paulo, v.17, n.4, p.597-604, dez. 2003.

SCHAFFER, W.B.; PROCHNOW, M. **A Mata Atlântica e você**: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira. Brasília: APREMAVI. 2002. 156p.

SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. Bell System Technicae Journal, 27: 379-423, 1948.

SAZIMA, M., BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest Sites in Brazil. Annals of Botany, n. 83, 1999, p.705-712.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. Nature, v.404, p.72-74, 2000.

SILVA, J.M.; SOUSA, M.C.; CASTELLETTI, C.H.M. Áreas of endemism for passerine birds in the Atlantic Forest. Global Ecology and Biogeography, v.13, p.85-92, 2004.

SIQUEIRA FILHO, J.A. LEME, E.M.C. Suplemento: *Neoregelia* Subgênero *Longipetalopsis*. In: Leme EMC (Ed). **Nidularium: Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Sextante Artes, 2000. p.229-237.

SIQUEIRA FILHO, J. A. Bromélias em Pernambuco: diversidade e aspectos conservacionistas. In: TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Atlas da biodiversidade de Pernambuco**. Recife. SCTMA & Massangana. 2001. p.219-228.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Bromelioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica, v.14, n.3, p.1493-2141, 1979.

SOUSA, G.M. **Estudos Taxonômicos do gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) em Pernambuco.** 1996. 126p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

SOUSA, G.M. & WANDERLEY, M.G.L. *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta botanica brasílica*, v.14, n.1, p. 77-97, 2000.

SOUZA, L.M.FI.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). *Scientia Florestalis*, n.65, p. 70-79. 2004.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; PERES, C.A. Effects of fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest southeastern Brazil. *Biological Conservation*, n.91, p.119-127, 1999.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, v.1, n.1, julho, 2005.

TERAO, D.; CARVALHO, A.C.P.; BARROSO, T.C.S. *Flores Tropicais*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225p.

TERRY, R.G.; BROWN, G.K.; OLMSTEAD, R.G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany*, n.84, p.664-670, 1997.

UCHOA NETO, C.A.M. E TABARELLI, M. Diagnóstico e Estratégias de Conservação do Centro de Endemismo Pernambuco. Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste – CEPAN: Coservation International do Brasil, jul. 2002, 69 p.

XIAO L.Q AND GONG, X. Genética differentiation and relationships of populations in the *Cycas balansae* complex (Cicadaceae) and its conservation implications. *Annals of Botany*, n.97, p. 807-812, 2006.

XIAO, L.Q.; GE, X.J.; GONG, X; HAO, G. AND ZHENG, S.X. ISSR Variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* v.94, p.133-138, 2004.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-6, 2002.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; VENCOSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetic and Molecular Biology*, v.26, n.4, p.449-457, 2003.

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

***VARIAÇÃO GENÉTICA EM Aechmea Fulgens Brongn.
(BROMELIACEAE) DETECTADA POR MARCADORES SSR E
ISSR.***

Artigo submetido a Revista de Biologia
e Ciências da Terra, Campina Grande –
Paraíba.

VARIAÇÃO GENÉTICA EM *AECHMEA FULGENS* BRONGN. (BROMELIACEAE) DETECTADA POR MARCADORES SSR E ISSR

Almeida^{1*}, C.M.A.; Silva²,M.V.; Resende³, L.V.

RESUMO

A fragmentação de habitats é conhecida por causar diferenciação entre populações e promover perda de variabilidade genética dentro dessas populações. O objetivo desse estudo foi comparar as informações genéticas obtidas a partir de marcadores SSR e ISSR sobre a variabilidade e estrutura genética de populações de *Aechmea fulgens* (Bromeliaceae). Bem com, avaliar os efeitos da fragmentação sobre estas populações. Populações naturais localizadas em e três fragmentos da Floresta Atlântica em Pernambuco, foram analisadas por meio de marcadores moleculares codominantes e dominantes. Os resultados mostram que a diferenciação genética entre as populações é pequena, sugerindo que o fluxo gênico entre as populações é ainda alto. O fluxo gênico estimado com base nos marcadores SSR e ISSR de 2.5 e 5.7, respectivamente, corroboram a pequena diferenciação populacional. Apesar dos marcadores possuírem diferentes naturezas ambos são igualmente informativos para estudos populacionais. A informação genética conjunta desses marcadores revelou que os efeitos da fragmentação foram pouco pronunciados até o momento.

Palavras-chave: Populações, marcadores moleculares, variabilidade genética.

ABSTRACT

Habitat fragmentation is known to cause genetic differentiation between small populations and decrease genetic variation within such populations. The aim of this study was to compare the genetic information obtained from SSR and ISSR markers on the variation and genetic structure of *Aechmea fulgens* (Bromeliaceae) populations. As well as to evaluate the fragmentation effects on these populations. Natural populations located in three fragments of the Atlantic Forest in Pernambuco State, were analysed using codominants and dominants markers. Genetic differentiation between population is small, suggesting that gene flow among populations is still high. The estimated gene flow base on SSR and ISSR data of 5.7 and 2.5 migrants per generation, respectively, corroborated the small populational differentiation. Despite the intrinsic difference among the markers used both were appropriate and congruently informative for population studies. Both markers displayed few pronounced effects of the fragmentation until this moment.

Keywords: Population, molecular markers, genetic variation.

Introdução

A Floresta Atlântica do Nordeste brasileiro inclui todas as florestas localizadas ao norte do Rio São Francisco. O grau de degradação dessas áreas é ainda maior do que o observado em outras regiões do Brasil (Silva e Tabarelli 2000). Esses remanescentes somam apenas 2% da área original da floresta e em sua maioria estão restritos a áreas privadas (Ranta et al., 1998). Estes remanescentes florestais abrigam muitas espécies endêmicas de bromélias que correm risco de extinção.

Em Pernambuco, o gênero *Aechmea* tem significativa representatividade onde ocorrem onze espécies distribuídas em diferentes ambientes do (Sousa e Wanderley, 2000; Leme e Siqueira Filho, 2001). A espécie *Aechmea fulgens* merece destaque como planta de valor econômico pelo seu potencial ornamental.

A espécie *Aechmea fulgens* Brongn. pertencente a subfamília Bromelioidea, família Bromeliaceae, apresenta hábito epífita, terrestre, ocorrendo também em afloramentos rochosos. Pode ser encontrada nos domínios da Mata Atlântica desde Pernambuco, Bahia até o Rio de Janeiro (Sousa e Wanderley, 2000). Em Floresta Atlântica as bromeliáceas congregam cerca de 30% dos recursos alimentares usados por beija-flores e morcegos (Sazima et al., 1999). Apesar de sua grande importância para as florestas tropicais, pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva da família Bromeliaceae (Martinelli, 1997). Algumas espécies dessa família apresentam mecanismos que favorecem a alogamia, porém a maioria é autocompatível. Sendo esse processo associado freqüentemente a polinização por vertebrados (Benzing, 1994; Martinelli, 1997).

O valor ornamental e a falta de produção comercial destas espécies levam a uma agressão às florestas nativas, de onde são coletadas em grandes quantidades para serem comercializadas no mercado interno e externo (Andrade e Demattê, 1999). A ação antrópica e a fragmentação de habitats são as maiores causas da erosão da biodiversidade nas florestas tropicais (Schaffer e Prochnow, 2002).

A preservação da diversidade genética constitui um dos principais objetivos dos programas de conservação e o primeiro passo é conhecimento da distribuição dessa diversidade dentro e entre populações naturais (Cavallari, 2004). Dentre as características mais importantes em genética de populações destacam-se o conhecimento do fluxo gênico e a diversidade e estrutura genética, por serem considerados essenciais na formulação de estratégias de manejo e de conservação (Martins, 1987). As metodologias de SSR e ISSR têm sido amplamente utilizadas em estudos com populações de plantas, devido à alta reprodutibilidade, robustez e, no primeiro caso, a sua natureza co-dominante.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade e estrutura genética de três populações de *Aechmea fulgens* em diferentes fragmentos da Mata Atlântica de Pernambuco, utilizando marcadores moleculares do tipo SSR e ISSR, comparando-os entre si quanto ao nível de polimorfismo e outros parâmetros populacionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécie em estudo

Aechmea fulgens, Brongn. é uma bromeliaceae endêmica da floresta atlântica. Além da importância ecológica, apresenta potencial econômico como planta de valor ornamental. Esta espécie foi utilizada neste estudo, por sua ampla distribuição nos fragmentos de Mata Atlântica no Estado de Pernambuco e pelo seu potencial ornamental. Como certificação de que a espécie em estudo se trata da *Aechmea fulgens*, um espécime proveniente de cada local de coleta foi identificado e depositado no herbário da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA).

A escolha da espécie e dos locais de coleta foram definidos após levantamento realizado nos herbários, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) e das Universidades Federal (UFPE) e Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), considerando-se: espécies comuns nos vários fragmentos, data de coleta mais recente e importância da espécie. As coletas do material vegetal foram realizadas em fragmentos da Mata Atlântica de três municípios do Estado de Pernambuco (Figura 1). Foram coletados pedaços de folhas jovens de 20 indivíduos de cada população.

Áreas de estudo:

Refúgio Ecológico Charles Darwin (07°48'37"S - 34°56'52" L) – localizado no município de Igarassu litoral Norte do Estado de Pernambuco, a cerca de 25 Km de Recife, possui uma área de aproximadamente 60 ha, cuja vegetação se encontra em processo de recomposição.

Estação Ecológica de Tapacurá (08°03'00"S e 35°13'00" L) localizada a 35 km a oeste de Recife no leste de Pernambuco, no município de São Lourenço da Mata, possui cerca de 382 ha.

Mata do Estado – Abrange aproximadamente 600 ha e está situada no município de São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte no Estado de Pernambuco, a cerca de 110 Km da cidade do Recife com coordenadas geográficas de 35 ° 30' 00''L – 07° 35' 00''S. Das áreas estudadas, é a que mais sofre perturbação antrópica.

Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizada a metodologia descrita por Ferreira e Grattapaglia (1998), com pequenas modificações. Essas modificações foram relativas a:

1 - Inicialmente foi pesado cerca de 1 grama de folhas e após maceração, o macerado foi dividido em várias alíquotas para a obtenção de uma boa quantidade do precipitado (*pellet*);

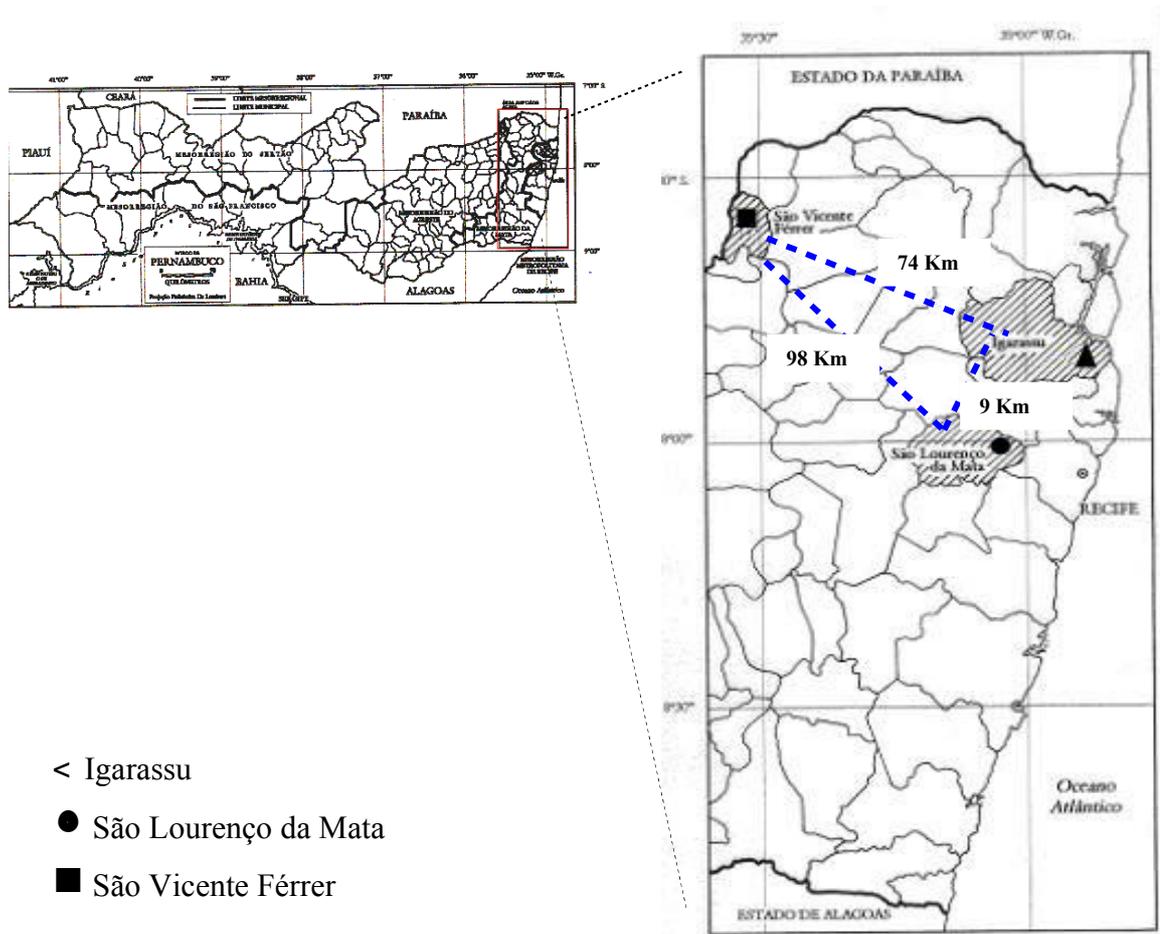
2 – As centrifugações finais foram realizadas numa rotação maior (10.000 rpm) e por mais tempo (10 minutos).

Ensaio de SSR

Inicialmente foram selecionados doze pares de oligonucleotídeos, desenvolvidos por Sarthou et al., (2003) e Boneh et al. (2003) para espécies dos gêneros *Pitcairnia*, *Tillandsia* e *Guzmania*, para testar a clareza e reprodutibilidade das ampliações. Destes, cinco foram escolhidos para as análises (Tabela, 1). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador MJ Research, Inc. PTC100 Programmable Thermal Controller (Watetown, USA) com ciclos programados de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação); 1 min a 52°C (anelamento); e 1 min a 72°C (extensão), seguidos de 7min a 72°C (extensão final dos fragmentos). Cada reação de 20 µL continha 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (DNTPs), 0,2 µM de cada par de oligonucleotídeo (direito e esquerdo) da Invitrogen, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 20 ng de DNA. Os produtos da amplificação foram resolvidos em gel de agarose 2.5% corados com SyBr Gold (1X, Invitrogen).

Ensaio de ISSR

Os oligonucleotídeos de ISSR utilizados (Tabela 2) foram selecionados de um conjunto produzido pela University of British Columbia, Vancouver, Canadá para *Sphagnum angermanicum* e *Pogonatum dentatum*. As ampliações do DNA foram realizadas em termociclador MJ Research, Inc. PTC100 Programmable Thermal Controller (Watetown, USA). Com um volume final de 25 µL cada reação continha 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (DNTPs), 0,2 µM de oligonucleotídeo da Operon Technologies, uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 20 ng de DNA. O programa de amplificação foi: 94°C por 15 min, 94°C por 30s seguido por 30-35 ciclos a 50-55 °C, (dependendo do primer utilizado). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose 2.0%, corados com SyBr Gold (1X, Invitrogen).



< Igarassu

● São Lourenço da Mata

■ São Vicente Férrer

Figura 1. Mapa de Pernambuco. Em destaque, área do domínio da Mata Atlântica e municípios onde foram realizadas as coletas de *Aechmea fulgens*.

Tabela 1. Oligonucleotídeos de SSR, espécie derivada, respectivas seqüências de bases e tamanhos dos fragmentos amplificados em amostras de *Aechmea fulgens*.

Oligonucleotídeo	Espécie derivada	Seqüência (5' – 3')	Tamanho (pb)
PI	<i>Pitcairnia geyskesii</i>	F:TTGAGCCATGAACAATAGGG R:AGAATTCTAGTGGCAGTCCTC	450- 350 pb
PII	<i>Pitcairnia geyskesii</i> <i>Pitcairnia</i>	F:GAGGATGAAGGATTTCCAAGG R:ACCGTCCCACGATAAGAGC F:AACCATTACATGCACCCTCAC	300 pb
PIII	<i>geyskesii</i> <i>Tillandsia</i>	R:TCACTGGGGAAGCCATAGAG	200 -100 pb
D	<i>fasciculata e</i> <i>Guzmania monostachya</i> <i>Tillandsia</i>	F:CGTACGAAGGTAAGCACAA R:CCGTTGAAGAGGTTAGAG F:AATGAGTTTCAGTTTTAGAAGC R:CCAAGAAAAGAACGGATCA	250- 110pb
E	<i>fasciculata e</i>		250 -110pb

ANÁLISE DOS DADOS

Marcadores ISSR e SSR

Os fragmentos de ISSR visualizados nos géis foram computados como presença (1) ou ausência (0). O resultando desses dados gerou uma matriz binária que foi analisada por meio do Programa POPGENE v. 1.31 (Yeh et al., 1999) para estimar alguns parâmetros populacionais: o percentual de locos polimórficos (P); estatísticas de F de Wright (Φ_{st}); diversidade genética de Nei (h) e o índice de Shannon (I). Os valores de F_{st} ; Φ_{st} foram usados para estimar o fluxo gênico entre as populações $N_m = 1/4 [(1/F_{st} - 1)]$; Wright (1951)]. A distância entre pares de populações foi medida pela distância genética de Nei (1978). Essas medidas foram então utilizadas para a construção do dendrograma, usando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average). A matriz de distância genética foi comparada à matriz de distância geográfica pelo teste de Mantel (Manly, 1997) a fim de se verificar a existência de associação entre essas. Os valores da distância geográfica foram transformados em \log_{10} visando maior proximidade da distribuição normal. O teste de Mantel foi realizado através do programa GENES, utilizando-se 1000 permutações aleatórias. A análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi utilizada para analisar a distribuição da variação genética total dentro e entre as populações, a partir de dados de marcadores ISSR, por meio do Programa GENES v. 2005.6.1 (Cruz, 2001).

Os marcadores SSR foram analisados para os mesmos parâmetros populacionais. Por se tratar de marcadores co-dominantes a inserção dos dados, no programa Genes, foram computados com 0 (para ausência de fragmentos), 1 (para heterozigotos) e 2 (para homozigotos).

Resultados

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos *locos* de microssatélites (SSR) (Tabela 1) geraram, dependendo do oligonucleotídeo, de um a cinco fragmentos por loco. Com tamanhos variando de 110 a 450 pares de bases (pb). A transferibilidade dos marcadores foram validadas entre os gêneros *Guzmania* e *Pitcairnia* e *Aechmea* pela amplificação de locos de mesmo tamanho em espécies dos referidos gêneros de bromélias. As percentagens de locos polimórficos foram, respectivamente, de 80% e 90.3%, para os marcadores SSR e ISSR e o número de alelos por loco variou de 1.6 a 1.8 para as três populações (Igarassu, Tapacurá e São Vicente) e para os dois marcadores utilizados.

O polimorfismo e tamanho dos fragmentos gerados pelos marcadores de ISSR podem ser observados na Tabela 2, onde estão relacionados os oligonucleotídeos de ISSR que foram utilizados e o percentual de polimorfismo produzido para o conjunto das populações. O número de fragmentos variou de 8 a 24 e os tamanhos dos fragmentos variaram de 350-2000 pb.

A diversidade genética molecular total para cada população pode ser observada tanto por meio do percentual de locos polimórficos (P) quanto pelo Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (I) e Diversidade Genética de Nei (h) (Tabela 3).

Através da AMOVA, com base em 60 locos polimórficos de ISSR, verificou-se que 9.1% da variabilidade genética está entre populações e 90.9% dentro de populações e o valor de Φ_{st} foi, portanto, igual a 0.0903. O valor de F_{st} (0.040) encontrado para dos dados baseados nos marcadores SSR também sugere baixa diferenciação entre as populações. O fluxo gênico estimado foi de 2.5 para as análises com marcadores ISSR e 5.7 para locos SSR.

Tabela 2. Oligonucleotídeos de ISSR utilizados e respectiva seqüência de bases, número de fragmentos amplificados e o polimorfismo produzido em amostras de *A. fulgens*.

Oligonucleotídeo	Seqüência	No. Fragmentos	No. Fragmentos polimórficos	Polimorfismo (%)
UBC	(5' → 3')			
808	(AG) ₈ C	18	17	94
810	(GA) ₈ T	17	15	90
813	(CT) ₈ T	12	10	88
834	(AG) ₈ YT	12	10	88
842	(GA) ₈ YG	10	10	100
845	(CT) ₈ RG	9	9	100
848	(CA) ₈ RG	7	6	88
890	VHV(GT) ₇	8	7	88
Total		93	84	90,3

Tabela 3. Diversidade genética molecular total para cada população de acordo com Percentual de locos polimórficos (P), Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (I) e Diversidade Genética de Nei (h), para cada população e marcadores moleculares estudados.

Parâmetro	População (local)		
	Igarassu	Tapacurá	São Vicente
	Maracadores SSR e ISSR	Maracadores SSR e ISSR	Maracadores SSR e ISSR
P (%)	80 85.48	80 90.3	80 96.7
I	0.55 0.53	0.51 0.51	0.51 0.56
h	0.39 0.37	0.35 0.35	0.36 0.38

Tabela 4. Matriz de distância genética (marcadores SSR) de Nei (1978) (diagonal superior) e distância geográfica (diagonal inferior) entre pares de populações de *A. fulgens*.

População	Igarassu	Tapacurá	São Vicente
Igarassu	-	0.0299	0.0159
Tapacurá	9 km	-	0.0673
São Vicente	74 km	98 km	-

Tabela 5. Matriz de distância genética (marcadores ISSR) de Nei (1978) (diagonal superior) e distância geográfica (diagonal inferior) entre pares de populações de *A. fulgens*.

População	Igarassu	Tapacurá	São Vicente
Igarassu	-	0.067	0.0415
Tapacurá	9 km	-	0.0686
São Vicente	74 km	98 km	-

Discussão

Diversidade genética

Segundo Murawski e Hamrick (1990), a proporção média de locos polimórficos para monocotiledôneas é de 40.3%. Esses autores examinaram 18 locos isoenzimáticos em populações de *Aechmea magdalenae* e encontraram um percentual médio de polimorfismo de 24.1%. Os marcadores ISSR utilizados nesse estudo geraram, pois, valores muito superiores aos encontrados pelos referidos autores. Os mesmos oligonucleotídeos utilizados nesse estudo geraram resultados semelhantes com em *Grevillea* (Proteaceae) (Pharmawati et al., 2004) e *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) (Xiao et al., 2004). Nesses trabalhos o número de fragmentos variou de 8-23 (UCB 808), 7-10 (UCB 842) e 8-24 (UCB 890). Pharmawati et al. (2004) obtiveram fragmentos, para os oligonucleotídeos UCB 808 (359-1558 pb) e UCB 890 (369-1385 pb), com tamanhos próximos aos encontrados nesse estudo, os quais variaram de 350-2000 pb. O percentual de polimorfismo (90,3%) foi próximo ao encontrado por Cavallari (2004) (89,8%) estudando populações de *Ecolirium biflorum* (Bromeliaceae) com marcadores RAPD.

Marcadores microssatélites, amplamente utilizados em vegetais, são considerados muito confiáveis por serem altamente específicos. Produzindo em geral um único fragmento, muitas vezes polimórficos ao nível infragenérico (Simon, 2002). No entanto, o número de fragmentos detectados depende do tamanho do genoma, da frequência das seqüências repetidas no genoma e do método de detecção (Barth et al., 2002). Nesse estudo os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos *locos* de microssatélites (Tabela 1) geraram, dependendo do oligonucleotídeo, de um a cinco fragmentos por loco.

O padrão alélico produzido pelos cinco pares de oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho permitiu caracterizar a espécie *Aechmea fulgens* com microssatélites desenvolvidos para o uso em estudos de outras espécies pertencentes a gêneros diferentes. De acordo com Zucoloto (2003), microssatélites podem ser transferidos entre espécies próximas, ou mesmo entre gêneros próximos. A transferibilidade desses marcadores entre espécies relacionadas é uma consequência da homologia das regiões flanqueadas pelos microssatélites e o tamanho da região entre o par de oligonucleotídeo responsável pela amplificação via PCR. A possibilidade do uso de microssatélites desenvolvidos para uma espécie na avaliação genética de outra espécie é de grande utilidade por reduzir consideravelmente os custos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Boneh et al. (2003) sugerem que os microssatélites desenvolvidos por eles para os gêneros *Tillandsia* e *Guzmania* podem ser aplicados para outras espécies dentro do gênero e até mesmo em gêneros próximos. De acordo com a análise filogenética da família Bromeliaceae realizada por Terry et al. (1997), o gênero *Aechmea* está muito distante dos referidos por Boneh et al. (2003), no entanto dois *primers* utilizados por esses autores foram úteis na caracterização de *A. fulgens*.

O percentual de locos polimórficos encontrado nesse trabalho foi alto se comparado com espécies arbóreas tropicais, para as três populações estudadas. Auler et al. (2002) encontrou uma média 43% de locos polimórficos e 1.8 alelos por loco em populações de *Araucaria angustifolia*, com marcadores isoenzimáticos, e considerou esses valores altos devido a essas populações estarem sob um bom 'status' de conservação em comparação com outras populações (20% e 1.4) mais degradadas. Os valores encontrados para o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (Shannon, 1948) foram, respectivamente para os marcadores SSR e ISSR: Igarassu: $I = 0.55$ e 0.53 ; Tapacurá: $I = 0.51$ e 0.51 ; São Vicente: $I = 0.51$ e 0.56 (Tabela 3). A diversidade genética variou de 0.35 a 0.39 nas três populações e para os dois marcadores (Tabela 3).

Distâncias genéticas

As distâncias genéticas de Nei, calculadas aos pares entre populações variou de 1.59% a 6.73% para os marcadores SSR (Tabela 4) e 4.15% a 6.86%, para os marcadores ISSR (Tabela 5). Os dendrogramas das distâncias entre populações formaram, para ambos os marcadores, dois grupos distintos populações 1 e 3 e a população 2 (Figuras 2 e 3), onde as populações mais próximas fisicamente ficaram em diferentes grupos, sugerindo ausência de associação entre distância geográfica e distância genética, este resultado foi confirmada pelo teste de Mantel que revelou a ausência de correlação entre a matriz de distância genética de Nei e distância geográfica para os dois marcadores utilizados. É importante ressaltar que os dois tipos de marcadores propiciaram o mesmo agrupamento a despeito de suas naturezas distintas.

Como o valor da distância de Nei é proporcional ao tempo decorrido da divergência e à taxa de substituição gênica por locos e por geração (Dias, 1998), os valores das distâncias genéticas encontrados nesse estudo e o agrupamento formado, indicam que as populações não divergiram a muito tempo sugerindo uma explicação para os altos valores dentro das populações e baixo entre elas.

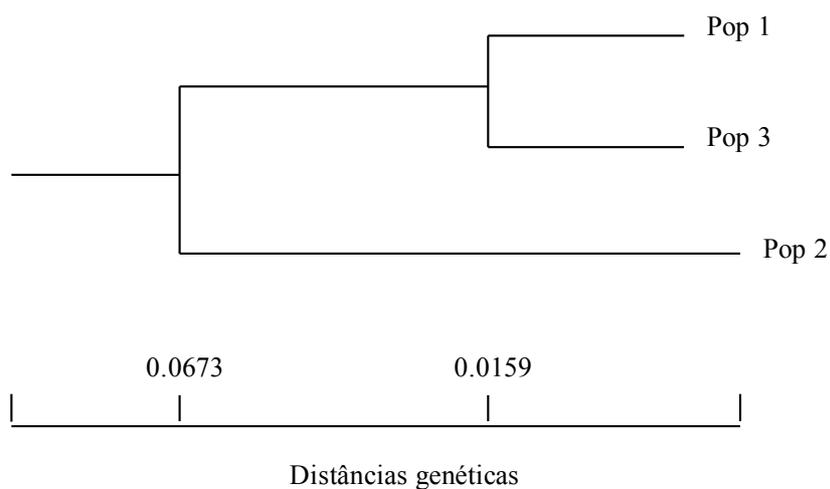


Figura 2. Dendrogramas de distâncias genéticas (SSR) de Nei (1978) entre três populações de *A. fulgens*. Pop 1: Igarassu; Pop 2: Tapacurá; Pop 3: S Vicente.

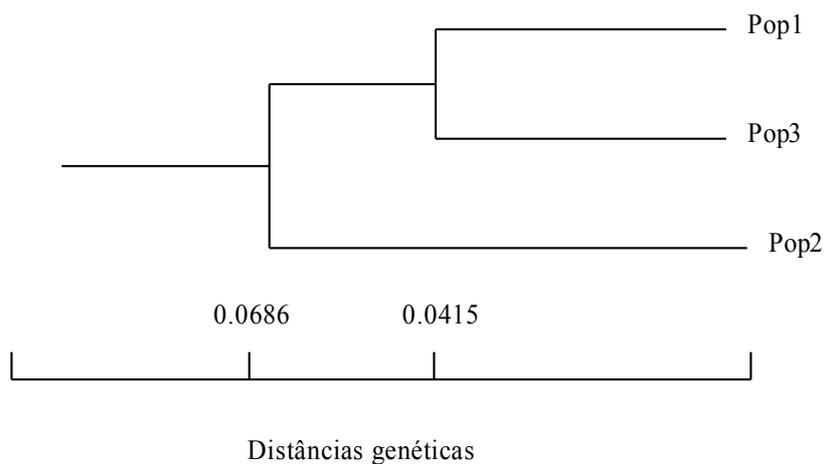


Figura 3. Dendrogramas de distâncias genéticas (ISSR) de Nei (1978) entre três populações de *A. fulgens*. Pop 1: Igarassu; Pop 2: Tapacurá; Pop 3: S Vicente.

Estrutura genética

Da diversidade genética total, foi detectado que a maior parte da variação esteve presente dentro das populações. Os resultados de alta diversidade dentro das populações estão de acordo com vários estudos com populações naturais de plantas (Camacho e Liston, 2001; Auler et al., 2002; Zucchi, 2002; Gusson, 2003; Conte, 2004; Cavallari, 2004; Melo Júnior et al., 2004; Souza et al., 2004; Xiao et al., 2004; Galeuchet et al., 2005). Galeuchet et al., (2005) utilizando sete locos de microssatélites encontram, em populações de *Lychnis flos-cuculi* L. (Caryophyllaceae), um $F_{st} = 0.02$. Os autores sugeriram que a baixa diferenciação entre as populações estudadas deve-se primeiramente ao significativo nível de fluxo gênico (Nm) histórico, quando as populações estavam mais conectadas entre si e segundo pelo fluxo gênico contemporâneo e pela dispersão antropogênica acidental de sementes.

O valor de Nm determina se a deriva genética, por si só, pode produzir variabilidade genética substancial entre locais. Se Nm for maior que 1.0, o fluxo gênico será alto o suficiente para prevenir uma diferenciação devido à deriva (Moraes e Derbyshire, 2002). Neste trabalho o fluxo gênico estimado entre as populações foi alto (2.5 e 5.7 para os marcadores ISSR e SSR, respectivamente) o que, juntamente com a alta variação genética dentro das populações, sugere baixo impacto da fragmentação de habitats sobre a diversidade genética de *Aechmea fugens* nos três ambientes estudados. Os valores de Nm , a exemplo de Galeuchet et al. (2005), devem se referir ao fluxo gênico histórico, pois apesar de serem, provavelmente polinizadas por pássaros e/ou morcegos, que apresentam grande amplitude de vôo, a maioria das bromeliáceas apresentam propagação clonal. Além disso os dendrogramas das distâncias genéticas (Figuras 2 e 3) indicam baixa divergência entre as populações estudadas.

Foré et al. (1992) estudaram a estrutura genética após a fragmentação em 15 populações de *Acer saccharum* (Aceraceae) e relacionaram o isolamento de fragmentos com níveis de diversidade genética. Os autores observaram baixa divergência entre os fragmentos ($F_{st} = 0.03$) e que o fluxo gênico foi maior após a fragmentação, neste caso, devido à maior incidência de vento e que a fragmentação não acarretou isolamento das populações. Souza et al. (2004), no entanto discordam de Foré et al. (1992), por terem observado alta divergência genética entre populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae) indicando, segundo os autores, que a fragmentação leva à deriva genética e ao aumento da divergência entre populações. Por outro lado, Nei (1978) afirma que quando ocorre redução no tamanho populacional, mesmo que o número de alelos seja reduzido, o grau de heterozigosidade e a diversidade genética podem permanecer tão alto quanto na população original. Isto se deve, na maioria dos casos, ao fato de que os alelos perdidos por deriva são raros, os quais contribuem pouco para o nível de heterozigosidade.

Conclusões

Os marcadores SSR e ISSR mostraram-se igualmente informativos nos estudos genéticos de populações de *Aechmea fulgens*.

Os microssatélites para diferentes gêneros de bromeliáceas foram úteis na caracterização de *A. fulgens*, sugerindo sua aplicação em estudos com outras espécies de *Aechmea*.

A diferenciação genética entre as populações foi pequena sugerindo que o fluxo gênico histórico entre as populações é ainda alto ou que a fragmentação não ocorreu a tempo suficiente para resultar numa diferenciação pronunciada. Não ficando, portanto, evidenciada conseqüências genéticas drásticas sobre as populações de *A. fulgens* nos fragmentos estudados.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Pernambuco, Brasil, pelo apoio e infraestrutura e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq/PADCT), Brasil, pelo apoio financeiro.

Referências

ANDRADE, F. S. A. & DEMATTÊ, M. E. S. P. Estudos sobre produção e comercialização de Bromélias nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, vol. 5. n. 2., 1999, p. 93-161.

AULER, NMF, REIS, MS, GUERRA, MP, AND NODARI, RO. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genetic and Molecular Biology* v.25 n.3., 2002.

BARTH, S.; MELCHINGER, A.E.; LÜBBERSTEDT, T.H. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, v.11, 2002, p.495-505.

BENZING, D.H. How much is known about Bromeliaceae in 1994?. *Selbyana*. v.15, n.1, 1994, p.1-7.

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

CAMACHO, J.F.; LISTON, A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *American Journal of Botany*, v.88, n.6, 2001, p.1065-1070.

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

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

CRUZ, C.D. *Programa Genes Versão Windows: Aplicativo Computacional em Genética e Estatística*. Viçosa: Editora UFV, 2001, 648 p.

DIAS, L.A.S. *Análises Multidimensionais*. In: Alfenas, AC (Ed.) *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: Editora UFV, 1998. 574p.

EXCOFFIER, L.; SMOUSES, P.E. AND QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, n.131, 1992, p.479-491.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3a. Ed. Brasília: CNARGEM-EMBRAPA, 1998, 220p.

FORÉ, A.S.; HICKEY, R.J.; VANKAT, J.L.; GUTTMAN, S.; SHAEFER, R.. Genetic structure after forest fragmentation: a lands ecology perspective on *Acer sacharum*. *Canadian Journal of Botany*, n.70, 1992, p.1659-1668.

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

GUSSON, E. *Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (Eschweilera ovata [Cambess.] Miers): subsídios ao manejo e conservação da espécie*. Piracicaba, 2003, 91p. (Dissertação) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

LEME, E.M.C.; SIQUEIRA FILHO, J.A. Studies in Bromeliaceae of Northeastern Brazil. *Selbyana*, v.22, n.2, 2001, p.146-154.

MANLY, B.F.J. Randomization, bootstrap and monte carlo methods in biology. Chapman & Hall, London, 1997.

MARTINELLI, G. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H.C. & Guedes-Bruni, R.R. (eds). *Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997, p.213-250.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação *in situ*. IPEF, n.35, abr./1987, p.71-78.

MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; POVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Scientia Florestalis*, n.66, 2004, p.56-65.

MORAES, P.L.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. *Biota Neotropica*, v.2, n.2, 2002, p. 2-17.

MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *American Journal of Botany*, v.77, n.9, 1990, p.1201-1208.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics*, v.89, 1978, p.583-590.

PHARMAWATI, M.; YAN, G; MCFARLANE, I.J. Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae). *Australian Systematic Botany* n.17, 2004, p.49-61.

RANTA, P.; BLOM, T.; NIEMELA, J.; JOENSUU, E.; SIITONEN, M. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodiversity and Conservation*, n. 7, 1998, p. 385-403.

SARTHOU, C.; BOISSELIER-DUBAYLE, M. C.; LAMBOURDIÈRE, J.; SAMADI, S. Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes*, n.3, 2003, p.221-223.

- SAZIMA, M., BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic Forest Sites in Brazil. *Annals of Botany*, n. 83, 1999, p.705-712.
- SCHAFFER, W.B.; PROCHNOW, M. *A Mata Atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira*. Brasília: APREMAVI. 2002. 156p.
- SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. *Bell System Technicae Journal*, n.27, 1948, p. 379-423.
- SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. *Nature*, v.404, 2000, p.72-74.
- SIMON, M.V. *Caracterização Genética de Acessos de Vigna savi (Fabaceae) com Marcadores de DNA*. Recife, 2002, 110p. (Dissertação) - Universidade Federal de Pernambuco.
- SIQUEIRA FILHO, J.A. *Biologia da polinização de Bromeliaceae em remanescente da Floresta Atlântica, Pernambuco*. Recife, 1998, 77p. (Dissertação) – Universidade Federal de Pernambuco.
- SOUSA, G.M.; WANDERLEY, M.G.L. *Aechmea Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do Estado de Pernambuco, Brasil*. *Acta botanica brasílica*, v.14, n.1, 2000, p. 77-97.
- SOUZA, L.M.F.I.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). *Scientia Florestalis*, n.65, 2004, p.70-79.
- TERRY, R.G.; BROWN, G.K.; OLMSTEAD, R.G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany*, n.84, 1997, p.664-670.
- XIAO, L.Q.; GE, X.J.; GONG, X.; HAO, G.; ZHENG, S.X. ISSR Variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*, n.94, 2004, p.133-138.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, n.15, 1951, p.323-354.
- YEH, F.C.; BOYLE, T. YANG, R.C. *POPGENE*, the user friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. 1999, University of Alberta and centre for International Forest Research.
- ZUCCHI, M.I. *Análise da estrutura genética de Eugenia dysenterica DC utilizando marcadores RAPD e SSR*. Piracicaba, 2002, 130p. (Tese) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- ZUCOLOTO, R.B. *Desenvolvimento de seqüências de DNA microssatélite para estudo de populações remanescentes de Jacaré-de-Papo-Amarelo (Caiman latirostris), da região central do estado de São Paulo*. 2003, 118p. (Tese) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
-

¹ Pós-graduanda em Agronomia (Melhoramento Genético de Plantas), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Dois Irmãos, Recife, PE. Email: clebia.almeida@gmail.com:
*Autor correspondente.

² Profa. Dra. Depto. de Biologia, UFRPE, Recife – PE.

³ Profa. Dra. Depto. de Agronomia, UFRPE, Recife – PE.

ANEXOS

ANEXO 1

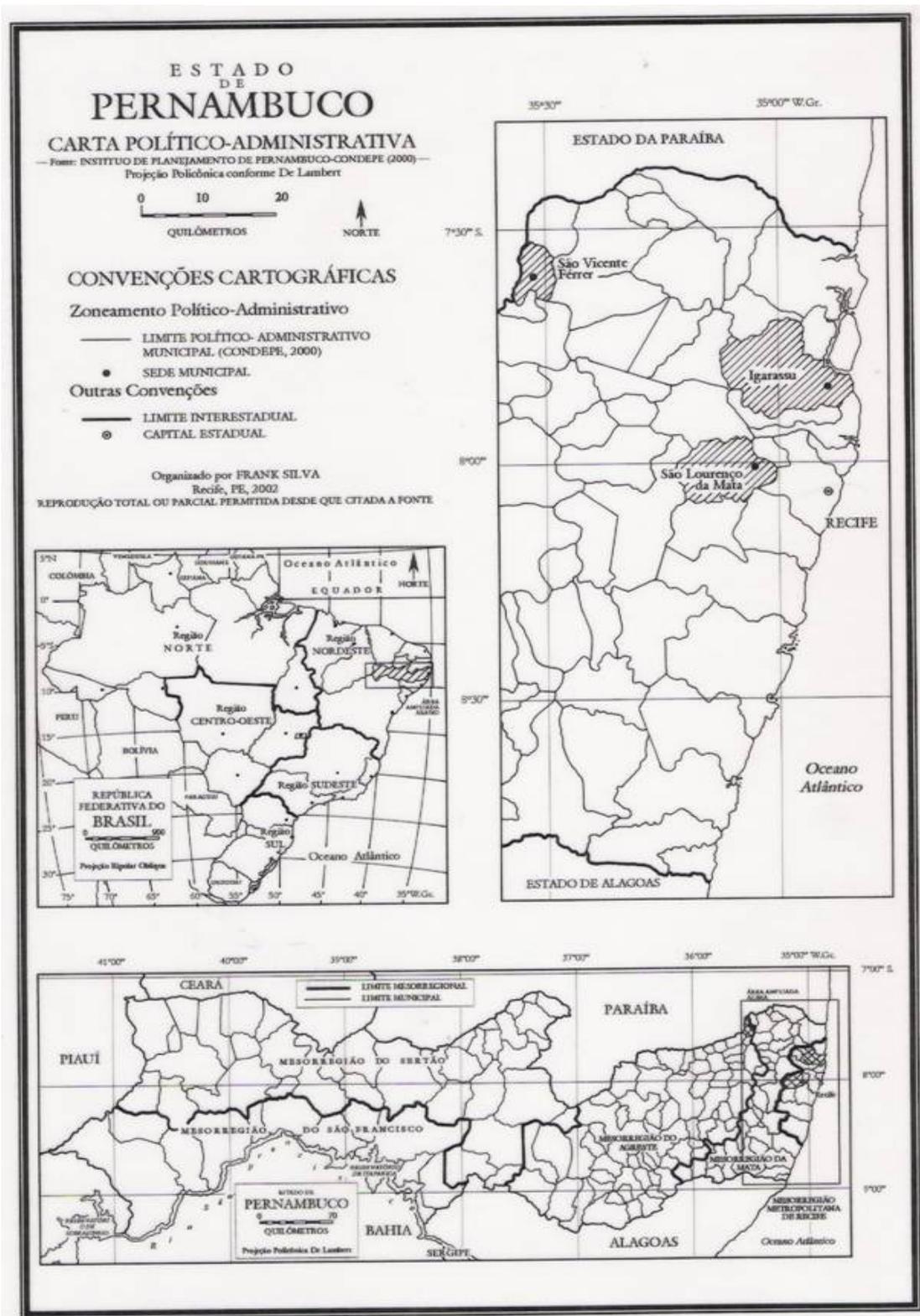


Figura 1. Mapa do Estado de Pernambuco. Destacando Municípios localizados nos domínios da Mata Atlântica onde foram realizadas as coletas de *Aechmea fulgens*.

ANEXO 2



Figura 1. *Aechmea fulgens*: a) Inflorescência ; b) Hábito epífita; c) *A. fulgens* var. *discolor*: d) Hábito terrestre.

Revista de Biologia e Ciências da Terra

Instruções

- Programa a ser utilizado: Microsoft Word for Windows;
- Fonte Times New Roman 14 para o título, Times New Roman 12 para o corpo do texto e Times New Roman 10 para o nome dos autores, tabelas e figuras
- Espaçamento simples entre linhas;
- Margens (todas): 2,0cm.
- Os trabalhos NÃO devem apresentar notas de rodapé. As observações serão inseridas no final de cada trabalho, bem como os Agradecimentos que poderão ser incluídos no final.
- As figuras devem ser "escaneadas" no formato ".gif" ou ".JPEG" e inseridas no texto com as respectivas indicações e informações.
- Os resumos deverão ser escritos em Inglês apresentados em um só parágrafo com máximo de 20 linhas ou 900 caracteres. As Palavras-chave deverão vir no máximo em 08.
- A extensão dos trabalhos deverá apresentar no máximo, 20 páginas.
- Incluir abaixo do título o(s) nome(s) do(s) autor(s) e formação acadêmica no fim conforme artigos já publicados.
- Exemplo de formatação

Normas básicas para referências bibliográficas:

Livros:

SOBRENOME(S), Nome(s). *Título em itálico*: subtítulo normal. Edição. Local: Editora, ano. nº páginas

Capítulos:

SOBRENOME(S), Nome(s). Título do Capítulo. In: SOBRENOME(S), Nome(s)(ed) ou (org). *Título em itálico*. Local: Editora, ano. nº páginas

Artigos:

SOBRENOME(S), Nome(s). Título do Artigo. *Título do Periódico em itálico*, volume, número, mês/ano, páginas consultadas,

Teses, dissertações, monografias:

SOBRENOME, Nome. *Título em itálico*. Local, ano, nº de páginas. (Tese, dissertação ou monografia) - Instituição.