

BRUNA FELIPPETTI ABONDANZA

**Estudos populacionais do complexo *Aechmea*
coelestis (K. Koch) E. Morren
(Bromeliaceae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2012

BRUNA FELIPPETTI ABONDANZA

**Estudos populacionais do complexo *Aechmea
coelestis* (K. Koch) E. Morren
(Bromeliaceae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA DAS GRAÇAS LAPA WANDERLEY

CO-ORIENTADORA (COLABORADORA): DRA. CLARISSE PALMA DA SILVA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Abondanza, Bruna Felipetti

A154e Estudos populacionais do complexo *Aechmea coelestis* (K.Koch) E. Morren (Bromeliaceae) / Bruna Felipetti Abondanza -- São Paulo, 2012.

88p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2012

Bibliografia.

1. Bromeliaceae. 2. Taxonomia. 3. Microssatélites. I. Título

CDU: 582.564

*Ao meu pai e ao Danilo,
Com todo meu amor e gratidão.*

*“Sometimes the questions are complicated
and the answers are simple.”
– Dr. Seuss*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu pai. Por ter me incentivado mesmo sem dizer nada, por acreditar nas escolhas que fiz e sempre ter fé em mim. Suas palavras nos momentos em que eu achei que não conseguiria foram fundamentais; sem seu apoio incondicional eu realmente não teria conseguido.

Ao Danilo agradeço por compartilhar essa vida comigo, seja nos dias bons ou nos ruins, sempre acreditando que o amor supera todos os obstáculos. Obrigada por me compreender e ter me ajudado tanto nesses anos, sempre me dando motivos pra continuar.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Maria das Graças Lapa Wanderley, pela confiança de que conseguiríamos encontrar respostas para toda a complexidade das *Aechmeas*, por todos os momentos de conversa e de *insights* sobre elas, por sempre me incentivar e por nunca ter desistido de mim.

E à minha também orientadora, Dra. Clarisse Palma da Silva, por ter compartilhado comigo seu conhecimento sobre a genética, por ter me ajudado no laboratório e em todas as análises e por sempre me ajudar quando precisei.

À Suzana E. Martins, por toda a paciência e compreensão, pelas saídas de campo, pela revisão e contribuição com o capítulo de morfologia e por sempre estar disposta a me ajudar.

Agradeço ao Instituto de Botânica e ao Programa de Pós-Graduação, aos funcionários e professores de disciplinas que colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES, por meio do Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro provindo dos projetos realizados pela Dra. Maria das Graças Lapa Wanderley e pela Dra. Clarisse Palma da Silva.

Aos membros da banca do exame de qualificação, Dra. Inês Cordeiro, Dr. Fábio de Barros e Dr. Paulo Takeo Sano, pelos conselhos e contribuições.

Aos membros da banca de defesa da dissertação Dr. Fábio Pinheiro e Dra. Tânia Wendt pela valiosa contribuição ao exemplar final.

Aos pesquisadores Dra. Maria Candida H. Mamede, Dra. Inês Cordeiro, Dra. Cintia Kameyama, Dra. Gerleni L. Esteves, Dr. Jefferson Prado, Dra. Lucia Rossi, Dra. Maria Margarida R.F. de Melo, Dra. Marie Sugiyama, Dra. Mizué Kirizawa, Dra. Rosangela Simão-Bianchini, Dr. Sérgio Romaniuc Neto, Msc. Sonia Aragaki e Dr. Tarcísio Filgueiras.

Ao Talisson R. Capistrano pelas risadas, caronas, companhia nas disciplinas, viagens, por me lembrar dos compromissos burocráticos e pela amizade.

Aos colegas de laboratório de Biologia Molecular Cecília H. Kano, César Redivo, Felipe A. Gonçalves e principalmente ao Rodrigo Pegorin, por ter sido sempre tão solícito e ter me ajudado sempre que precisei.

À Beatriz Zocoler Almeida, por, além de ter me ensinado muito e passado horas no laboratório comigo, ter se tornado minha amiga. Sua ajuda foi indispensável!

À Márcia Goetze por compartilhar comigo conhecimentos sobre as *Aechmea*, pela companhia nas saídas de campo, fotos e bibliografia e por toda a ajuda no laboratório.

À Camila M. Zanela pelas saídas de campo, fotos e por sempre estar disposta a me ajudar.

Aos bromeliólogos e às xiridólogas, Rafael B. Louzada, Anderson Luiz dos Santos, Luciana Fiorato, Bianca Alsina Moreira, Adalton, Gisele Oliveira e Juliana dos Santos.

Aos colegas do Herbário, em especial ao Allan C. Pscheidt, Victor M. Gonzalez, Cátia Takeuchi, Rafael F. Almeida, Rodrigo Sampaio Rodrigues e Cintia Vieira.

Aos meus tios, Wilma A. Kuhlmann e Itagyba Kuhlmann por terem me apresentado ao mundo da Botânica e por terem compartilhado tantas coisas comigo. Obrigada por todo o carinho e confiança.

À Mayra por ter sido sempre tão presente na minha vida desde o berço e me dar esperança e conforto nas horas em que eu me senti sem rumo.

À Mauren por compartilhar comigo as dores e felicidades da vida acadêmica, por ser tão parecida comigo e pela grande amizade.

À Maria Rita pelas conversas, risadas, divagações, meditações, momentos de dúvida existencial e por sempre conseguir me animar.

Às minhas amigas Debora, Beatriz e Denise, e também ao Rafa, por serem uma extensão da minha família.

Aos amigos Marquinhos, Naná, Rafael M.S. Santos, Omar, Luquinhas, Tati e Felipe R. Pinto. Vocês são indispensáveis!

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com este trabalho e que foram esquecidos pela minha memória...

Obrigada!

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
Família Bromeliaceae	4
Genética de Populações em Bromeliaceae	7
Ferramentas moleculares: microssatélites.....	8
Gênero Aechmea	9
Complexo Aechmea coelestis	10
OBJETIVOS GERAIS	12
Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO I	13
<i>Circunscrição do complexo Aechmea coelestis</i>	13
<i>(K. Koch) E. Morren (Bromeliaceae)</i>	13
Introdução.....	14
Metodologia	17
Resultados e discussão.....	18
Material Examinado	24
CAPÍTULO II.....	30
<i>Genética de populações do complexo Aechmea coelestis (K. Koch) E. Morren (Bromeliaceae)</i>	30
Introdução.....	31
Metodologia	34
Coleta do material e extração de DNA	34
Análises moleculares dos marcadores de microssatélites	34
Genotipagem e análise dos SSR	35
Análises estatísticas.....	35
Resultados.....	37
Análises moleculares	37
Análises estatísticas.....	37

Discussão.....	40
Amplificação heteróloga	40
Diversidade e estrutura genética de Aechmea coelestis	41
Delimitação taxonômica do complexo Aechmea coelestis	45
Conclusões	48
Tabelas e índice de figuras.....	49
Apêndice.....	61
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO

Bromeliaceae é a maior família exclusivamente neotropical de angiospermas com mais de 3000 espécies. *Aechmea*, um dos maiores gêneros da família, possui cerca de 250 espécies distribuídas desde o México até o sul da Argentina. No Brasil, ocorre a maior diversidade de espécies deste gênero. *Aechmea coelestis* (K. Koch) E. Morren é encontrada na Floresta Atlântica da região Sul e Sudeste do Brasil, juntamente com *A. gracilis* Lindm. e *A. organensis* Wawra. Estes táxons se apresentam como um complexo de espécies de difícil delimitação morfológica. A grande variação morfológica, tanto inter quanto intrapopulacional observada nestes táxons e a sobreposição de caracteres entre eles, levantaram a hipótese que poderia se tratar de um único táxon com grande polimorfismo. Dessa forma, os objetivos deste estudo são: 1) descrever a variação morfológica existente entre populações das espécies do complexo, por meio do estudo de caracteres morfológicos; e 2) descrever a estrutura genética das populações do complexo *Aechmea coelestis*, por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites nucleares. As duas abordagens se complementam, visando o melhor embasamento na delimitação desses táxons. Foram examinadas as exsicatas, incluindo observação mais detalhadas de algumas características, como tricomas, múcron apical de sépalas e brácteas e morfologia das flores. Foram realizadas medições e comparações com a diagnose e o material tipo, quando disponível. A análise genética foi feita com sete marcadores moleculares microssatélites (SSR) multilocus aplicados ao nível populacional. Os resultados dessas análises revelaram alta diversidade genética em todas as populações analisadas (média $H_e = 0,703$) e estrutura populacional moderada/alta ($F_{ST} = 0,168$) em *Aechmea coelestis*. Os altos índices de coeficiente de endocruzamento ($F_{IS} = 295$) indicam que a espécie possui altos índices de endogamia e/ou subdivisão entre as populações. Não existem evidências genéticas para a consideração de espécies distintas, já que foi observada baixa diferenciação dos grupos (5%). *Aechmea coelestis* apresenta amplo polimorfismo de caracteres florais e vegetativos, o que levou os especialistas a considerarem três espécies distintas. Entretanto, com a revisão taxonômica deste grupo, verificou-se que se trata de uma única espécie, sendo aqui propostos dois novos sinônimos em *A. coelestis* (*A. gracilis* e *A. organensis*). Os dados morfológicos e genéticos corroboram o novo conceito para *Aechmea coelestis*.

ABSTRACT

Bromeliaceae is the largest exclusively neotropical angiosperm Family, with over 3000 species. *Aechmea*, one of the largest genus in the family, comprises approximately 250 species distributed from Mexico to south of Argentina. The major diversity of species within the genus occurs in Brazil. *Aechmea coelestis* (K. Koch) E. Morren is found in the South and Southeastern Brazilian rainforest, along with *A. gracilis* Lindm. e *A. organensis* Wawra. These taxa form a species complex of difficult morphological delimitation. The vast morphological variation, inter and intra-population, observed in these taxa and the character overlapping between them made arise the possibility of only one taxa with great polymorphism. Therefore, the objectives of this study are: 1) describe the morphological variation within the populations of this complex, by morphological characters; and 2) describe the genetic structure of the *Aechmea coelestis* complex populations, using nuclear microsatellite molecular markers. Both approaches are complementary, seeking an improved basis for delimitation of these taxa. Exsiccata were examined, including detailed observation of a few characters, such as trichome, sepal and bractea apex mucron and the morphology of flowers. They were also measured and compared to diagnosis and type material, when available. Genetic analysis were made with seven multilocus microsatellite molecular markers (SSR) applied to population level. Results of this analysis revealed high genetic diversity (overall $H_e = 0,703$) and moderate/high populational structure ($F_{ST} = 0,168$) in all analyzed population of *Aechmea coelestis*. High inbreeding coefficient ($F_{IS} = 295$) indicates high endogamy levels and/or population subdivision within the species. There are no genetic evidence to consider these as distinct species once group differentiation is low (5%). *Aechmea coelestis* shows ample polymorphism of floral and vegetative characters, which has made specialists, for a long time, consider three distinct species. However, with the taxonomic review of this group, the existence of only one species has been confirmed, thus two new synonyms are proposed here for *A. coelestis* (*A. gracilis* e *A. organensis*). Morphological and genetic data corroborate the new *A. coelestis* species concept.

Introdução Geral

FAMÍLIA BROMELIACEAE

Bromeliaceae possui 3.172 espécies, distribuídas em 58 gêneros (Luther 2008). Estes números vêm sendo constantemente alterados pelas descobertas de novos táxons e mudanças taxonômicas e nomenclaturais continuamente propostas, em parte devido à difícil delimitação genérica e específica pela ocorrência de muitas homoplasias na família (Givnish 2004).

É a maior família quase exclusivamente neotropical de angiospermas, estendendo-se desde o sul da América do Norte, passando pela América Central até chegar a Patagônia (Argentina) na América do Sul. Apenas uma espécie, *Pitcairnia feliciana*, é referida para o continente africano (Smith & Downs 1974, 1977, 1979; Wanderley & Martins 2007), sendo provável resultado de uma dispersão a longa distância (Givnish *et al.* 2004).

Os dois maiores centros de diversidade da família são o leste do Brasil e a região dos Tepuis na Venezuela. O Brasil detém um elevado número de representantes da família, estimando-se que cerca de 70% dos gêneros e 40% das espécies ocorram no Brasil, especialmente na região Sudeste (Wanderley & Martins 2007).

Um conjunto de características torna Bromeliaceae uma família facilmente reconhecível, sendo morfológica e anatomicamente distinta de outras monocotiledôneas. Apresenta hábito geralmente herbáceo, presença de escamas foliares multicelulares e absorventes, estigmas espiral-conduplicados e número básico de cromossomos $n = 25$, características que também representam sinapomorfias do grupo (Brown & Gilmartin 1984, 1988, 1989).

A família é caracterizada por apresentar plantas herbáceas epífitas, rupícolas ou terrícolas, com caule geralmente curto ou, mais raramente, desenvolvido. As folhas são

alternas, polísticas, em geral, formando roseta. A bainha foliar é geralmente alargada, com a superfície recoberta por tricomas especializados. Essas estruturas típicas da família são denominadas de escamas, desempenhando importante papel ecológico e fisiológico (Smith & Downs 1974, Rauh 1990, Benzing 2000)

As folhas possuem margens inteiras, serrilhadas ou espinescentes. A inflorescência é simples ou composta, terminal ou lateral, reunindo poucas a numerosas flores dispostas em panículas, racemos ou espigas. Apresenta forma variada como capituliforme, cilíndrica, piramidal. O escapo pode ser longo, curto ou ausente, portando brácteas, em geral coloridas e vistosas. As flores são bissexuadas, raramente funcionalmente unissexuadas, actinomorfas a zigomorfas, trímeras, hipóginas a epíginas, geralmente subtendidas por uma bráctea vistosa (Cronquist 1981, Dahlgren *et al.* 1985, Wanderley & Martins 2007).

Pelas características muito peculiares apresentadas, Bromeliaceae foi incluída por muito tempo como a única família da ordem Bromeliales (Cronquist 1981; Dahlgren *et al.* 1985), sendo considerada atualmente, com base em estudos moleculares e filogenéticos, na ordem Poales (APGIII, 2009).

Com base na biologia molecular, é considerada uma família monofilética, mas a classificação infrafamiliar permanece ainda não totalmente resolvida, principalmente quanto ao relacionamento entre as subfamílias e a circunscrição de gêneros em Bromelioideae e Tillandsioideae (Smith & Till 1998; Brown & Leme 2000; Horres *et al.* 2000; Till 2000; Faria *et al.* 2004; Barffus *et al.* 2005).

É tradicionalmente dividida em três subfamílias, Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, distintas essencialmente pelo hábito, posição do ovário e tipo de frutos e sementes (Smith & Downs 1974; 1977; 1979). O estudo cladístico apresentado por Givnish *et al.* (2007) foi fundamentado nos resultados de sequências de *ndhF*, analisando

vários táxons das três subfamílias, corrobora que Bromelioideae e Tillandsioideae são monofiléticas, enquanto que Pitcairnioideae apresenta-se parafilética. Os autores propõem a criação de quatro novas subfamílias a partir desta.

Apesar dos estudos feitos nas últimas décadas acerca da circunscrição dos grupos em Bromelioideae, ainda não há conclusão sobre as suas relações. Diversas mudanças taxonômicas foram realizadas, baseadas em caracteres morfológicos, especialmente no grupo formado pelo gênero *Aechmea* e proximamente relacionados. Sendo assim, é essencial um tratamento taxonômico completo em grupos críticos como esse (Horres *et al.* 2000).

Características morfológicas tem sido usadas para delimitação de espécies há muito tempo, e por muitas vezes permitem a classificação de espécies (Duminil & Michele, 2009). Porém, indivíduos da mesma espécie podem apresentar variações morfológicas que podem ser fruto de uma adaptação local (Scarano, 2002; Cavallero, 2008), sendo assim criadas duas espécies que refletem as variações destes indivíduos. Em oposição, espécies de um mesmo gênero podem apresentar similaridades morfológicas e serem agrupadas em uma mesma espécie, apesar do fato de representarem duas entidades taxonômicas diferentes (Shaw, 2000; Chan *et al.*, 2002; Whittall *et al.*, 2004). Desta maneira, nas últimas décadas o número de estudos de delimitação de espécies que se utilizam de técnicas moleculares aumentou drasticamente (Duminil & Michele, 2009), sendo que uma das metodologias propostas para delimitação de espécies envolve o estudo de genética de populações, especialmente com marcadores nucleares microssatélites (Shaffer & Thomson, 2007), criando-se assim o que podemos chamar de taxonomia integrativa (Padiál *et al.* 2010).

GENÉTICA DE POPULAÇÕES EM BROMELIACEAE

O Brasil é o maior centro de diversidade de bromélias, onde podemos encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas. Em especial o leste brasileiro é um dos principais centros de diversidade de Bromélias e com inúmeros gêneros endêmicos (Benzing 2000). Uma região com alta riqueza de espécies e altos níveis de endemismo é considerada um ótimo cenário para a especiação, e disponibiliza um excelente sistema modelo para o estudo de hipóteses sobre evolução do isolamento reprodutivo (Van der Niet et al 2006; Wendt et al 2008). As bromélias vem sendo estudadas por pesquisadores interessados em microevolução e especiação na região Neotropical (e.g. Sarthou et al 2001; Cavallari et al 2006; Barbará et al 2007; 2008; 2009; Palma-Silva et al 2009).

A atividade humana em áreas naturais influencia fortemente a estrutura genética de populações de plantas, e uma de suas principais consequências é a perda de variabilidade através de deriva genética e endocruzamento resultantes da redução intensa no tamanho das populações e extinção de algumas delas, principalmente nos casos de fragmentação do hábitat (Cozzolino et al 2003; González-Astorga et al 2004; Ribeiro et al 2005). Segundo Fay e Krauss (2003), para que a variabilidade genética de populações naturais seja conservada, é preciso garantir a continuidade dos processos naturais responsáveis pela manutenção dessa diversidade, garantindo a interação das espécies principalmente em áreas de contato, nas quais pode ocorrer hibridação e/ou introgressão. A identificação de diferentes populações como pertencentes a uma única espécie pode mascarar a existência de diferentes linhagens, com constituições genéticas distintas, às vezes com diferentes origens, sendo muito importante seu reconhecimento para que medidas de conservação da diversidade possam ser implementadas (Squirrell et al 2002).

FERRAMENTAS MOLECULARES: MICROSSATÉLITES

Com o emprego de técnicas que se baseiam em comparações entre tamanhos de enzimas ou fragmentos de DNA, pode-se obter a resolução necessária para se estabelecer relações de parentesco entre espécies, linhagens ou mesmo populações. Dentre as técnicas que se baseiam em fragmentos de DNA, os marcadores do tipo microssatélites tem sido a técnica mais informativa para processos evolutivos ocorridos num período recente (Ferreira e Grattapaglia 1998). Os marcadores de microssatélites são sequências constituídas de DNA repetitivo, dispostas lado a lado, onde pequenos motivos (1 a 6 pares de base) são repetidos várias vezes. Representam regiões instáveis do genoma, que estão sujeitas a alterações mutacionais, geralmente adições ou deleções de um número integral de repetições, com taxa muito mais elevada do que taxas observadas em sequências de DNA não repetitivo (Jarne e Lagoda 1996). Estão distribuídos ao longo de sequências codificantes e não codificantes do DNA (Schlötterer e Tautz 1992). Estas regiões repetitivas têm sido identificadas nos genomas de procaríotos e eucariotos. Em eucariotos são encontrados nos três genomas: núcleo, cloroplasto (Powell et al 1995) e mitocôndria (Soranzo et al 1999). Os marcadores microssatélites *nucleares* são de natureza codominante e possuem herança mendeliana. A grande vantagem na utilização destes marcadores está associada ao fato de, na maioria dos casos, representarem um único loco o qual é frequentemente multialélico, devido principalmente à alta taxa de mutação que estas regiões do genoma apresentam. Assim, estes marcadores moleculares podem ser utilizados para resolver questões de diferentes ordens: a paternidade, a estrutura genética de populações e as comparações entre espécies proximamente relacionadas (McDonald e Potts 1997). Além disso, marcadores codominantes nucleares, como os microssatélites, podem ser usados para

delimitação de espécies, mesmo em se tratando de complexos que apresentam divergência recente, por meio de diferentes metodologias (Marshall *et al.*, 2006).

GÊNERO AECHMEA

O gênero *Aechmea* Ruiz e Pav. possui cerca de 240 espécies, sendo o maior gênero da subfamília Bromelioideae. Suas espécies distribuem-se desde o México até o sul da Argentina. No Brasil, ocorre a maior diversidade de espécies deste gênero, que está dividido, segundo Smith & Downs (1979), em oito subgêneros: *Aechmea* Ruiz & Pavon, *Chevaliera* (Gaudich. Ex. Beer) Baker, *Lamprococcus* (Beer) Baker, *Macrochordion* (De Vriese) Baker, *Ortgiesia* (Regel) Mez, *Platyaechmea* (Baker) Baker, *Podaechmea* Mez e *Pothuava* (Baker) Baker. Porém, ao longo da história já foram propostas várias classificações genéricas e infragenéricas para *Aechmea* (Baker 1879, 1889; Mez 1892, 1896, 1934-35; Smith & Kress 1989, 1990)

As principais características utilizadas para separar os subgêneros são: tipo da inflorescência (simples ou composta), flores sésseis ou pediceladas, simetria das sépalas e morfologia dos apêndices petalinos. Estas características não são muito consistentes, dificultando a delimitação entre estes subgêneros. Algumas vezes são observadas espécies mal posicionadas no respectivo subgênero ou mesmo no próprio gênero *Aechmea*. Algumas espécies também apresentam circunscrições problemáticas como: *Aechmea coelestis* (K. Koch) E. Morren, *A. gracilis* Lindm. e *A. organensis* Wawra, pertencentes ao subgênero *Ortgiesia* (Wanderley & Martins 2007).

COMPLEXO AECHMEA COELESTIS

Durante os estudos realizados para a elaboração da monografia de Bromeliaceae na Flora do Estado de São Paulo (Wanderley & Martins 2007), verificou-se o polimorfismo deste grupo de espécies, que apresentam grandes afinidades morfológicas, com algumas características comuns, tanto em relação ao hábito como em relação às partes florais. As espécies florescem duas vezes ao ano, com períodos sobrepostos: *Aechmea coelestis* floresce em fevereiro e setembro, *A. gracilis* de maio a junho e de agosto a novembro e *A. organensis* em fevereiro e junho. Apresentam flores azuis ou violeta, com sépalas providas de longo espinho apical. Além destas características, partilham também a mesma distribuição geográfica, sendo que *A. coelestis* e *A. organensis* ocorrem do Espírito Santo ao Paraná, e *A. gracilis* se restringe a São Paulo e Paraná. Apesar do padrão de inflorescência ajudar na separação das espécies, se observa sobreposições de características. Em *Aechmea gracilis*, onde predomina o padrão simples, pode ocorrer inflorescência ramificada e em *A. organensis*, com padrão predominante composto, a inflorescência também pode sofrer redução de ramos, apresentando-se algumas vezes simples. *A. coelestis* destaca-se pelo porte maior e flores com pétalas azuis mais claras, mas também foram observados indivíduos intermediários entre esta espécie e *A. organensis*. As três espécies ocorrem como epífitas ou mais raramente rupícolas ou terrícolas em ambientes florestais, sendo que *A. organensis* apresenta maior área de distribuição.

Pela análise de coleções de herbário, estas espécies são muito difíceis de serem identificadas, tanto pela dificuldade de observar as estruturas morfológicas em material seco (p.ex. forma do ovário), como pelo polimorfismo das espécies deste grupo, conforme já discutido. Há problemas também com relação ao material-tipo dessas

espécies, sendo que o de *Aechmea organensis* foi destruído e a descrição de *A. coelestis* foi baseada em material cultivado (Wanderley & Martins 2007).

OBJETIVOS GERAIS

Este estudo contribuirá para o esclarecimento de problemas de delimitação do complexo *Aechmea coelestis*, pertencente ao subgênero *Ortgiesia*, por meio de análises da estrutura e diversidade genética e da variabilidade morfológica de populações naturais do complexo de espécies alvo deste estudo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Compreender a variação morfológica existente entre e dentro das populações do complexo *Aechmea coelestis* (Bromeliaceae), por meio do estudo de caracteres morfológicos.
- b. Descrever a estrutura e variabilidade genética das populações do complexo *Aechmea coelestis*, por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites nucleares.

Capítulo I

*Circurscrição do complexo *Aechmea coelestis*
(K. Koch) E. Morren (Bromeliaceae)*

INTRODUÇÃO

Aechmea é o maior gênero de Bromelioideae (Bromeliaceae), reunindo aproximadamente 250 espécies (Luther, 2008), sendo 172 brasileiras (Forzza *et al.*, 2010). De acordo com Smith & Downs (1979) está subdividido em oito subgêneros: *Aechmea* Ruiz & Pavon, *Chevaliera* (Gaudich. ex. Beer) Baker, *Lamprococcus* (Beer) Baker, *Macrochordion* (De Vriese) Baker, *Ortgiesia* (Regel) Mez, *Platyaechmea* (Baker) Baker, *Podaechmea* Mez e *Pothuava* (Baker) Baker. Apesar de já terem sido conduzidos diversos estudos morfológicos e filogenéticos (Faria *et al.*, 2004; Schulte *et al.*, 2009), o conceito genérico de *Aechmea* e de outros gêneros afins ainda é problemático. Conforme Sass & Specht (2010), muitos gêneros da família, assim como os subgêneros de *Aechmea*, que são polifiléticos apresentam localização geográfica disjunta, emergindo em clados que refletem proximidade geográfica e não similaridade morfológica. Dessa forma, algumas espécies do gênero *Aechmea* são encontradas emergindo em diferentes gêneros, como *Billbergia* e *Ananas*, assim como espécies de outros gêneros, como *Quesnelia arvensis* e *Billbergia zebrina*, emergem relacionadas com espécies do subgênero *Ortgiesia* (Sass & Specht, 2010).

A separação dos subgêneros é feita por meio de caracteres pouco consistentes, revelando certa artificialidade na taxonomia deste gênero, cuja difícil circunscrição morfológica dos subgêneros é notoriamente reconhecida por diferentes autores (Wendt 1997, Faria *et al.* 2004, Wanderley & Martins 2007, Horres *et al.* 2007). As principais características usadas para delimitar os subgêneros referem-se ao padrão de inflorescência simples ou composto, flores sésseis ou pediceladas, simetria das sépalas e morfologia dos apêndices petalinos. Estes caracteres, apesar de contribuírem para a separação destes subgêneros, e também entre *Aechmea* e outros gêneros afins, são muito

variáveis na subfamília e até mesmo dentro de uma mesma espécie (Shculte & Zizka, 2008). Este polimorfismo e a recorrente sobreposição de caracteres tornam as classificações artificiais, com espécies de posicionamento duvidoso no respectivo grupo, como apontado por diversos estudos (Faria *et al.*, 2004; Wanderley & Martins, 2007; Sass & Specht, 2010).

O subgênero *Ortgiesia*, segundo Luther (2008), reúne cerca de 22 espécies, entretanto o número de espécies para *Ortgiesia* é impreciso, considerando as constantes mudanças de espécies de um subgênero para outro de *Aechmea*, conforme posicionamentos taxonômicos adotados.

Ortgiesia caracteriza-se por apresentar inflorescência composta ou simples, com flores laxa ou densamente dispostas. As flores são sésseis, com sépalas conatas e mucronadas, sendo o múcron tão longo quando o lobo livre da sépala e as pétalas apresentam apêndices evidentes (Smith & Downs, 1979). Algumas espécies do subgênero apresentam afinidade morfológica e difícil circunscrição, como destacado por Wanderley & Martins (2007). Esse subgênero apresenta distribuição predominante nas florestas ombrófila densa e ombrófila mista das regiões Sudeste e Sul do Brasil. Ocorre também na Argentina e Uruguai nas regiões limítrofes com o Brasil.

Os principais caracteres usados na separação dos táxons deste subgênero são o padrão da inflorescência (composta ou simples), comprimento da flor, coloração das pétalas, forma do ovário e comprimento do múcron da sépala. Estes táxons podem ainda compartilhar a mesma área de distribuição geográfica e o período de floração (Wanderley & Martins, 2007).

Dentro de *Ortgiesia*, é possível reconhecer um grupo de espécies representado por *Aechmea coelestis* (K. Koch) E. Morren, *A. gracilis* Lindm. e *A. organensis* Wawra, cuja variabilidade interespecífica torna pouco precisa sua delimitação com base na

morfologia. Esta difícil circunscrição resulta em problemas quanto à identificação destes táxons.

Com o objetivo de elucidar a delimitação destes três táxons, que no Brasil são amplamente distribuídas na Floresta Atlântica desde o Sudeste até o Sul, e cujas identificações observadas nos herbários são controversas, o presente trabalho propõe, por meio de análises das populações no ambiente natural e em coleções-vivas, clarear os limites entre as mesmas. Paralelamente, foi realizado o estudo de genética de populações com o referido grupo, sendo importante para a correlação com dados morfológicos analisados.

METODOLOGIA

Para a realização do presente trabalho foram examinados acervos dos seguintes herbários: SP, RB, ESA, UEC e UPCB. Foi analisado todo o material identificado sob *Aechmea coelestis*, *A. organensis* e *A. gracilis* além de espécies afins. Foram efetuadas medições e comparações com a diagnose de cada espécie, assim como o material-tipo observado em fotografias. As exsicatas foram examinadas sob o estereomicroscópio para observação mais detalhada de outros caracteres florais e vegetativos.

Além da ampla coleção obtida durante a realização da monografia de Bromeliaceae para a Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, incluindo coletas nas localidades típicas das espécies estudadas, novas coleções foram obtidas durante o desenvolvimento do presente trabalho, abrangendo localidades selecionadas de ocorrência das espécies (Tabela 1). Os espécimes coletados foram georreferenciados, as exsicatas depositadas no Herbário SP e alguns exemplares foram incorporados à coleção-viva do Bromeliário do Instituto de Botânica de São Paulo.

No presente trabalho foi dada a continuidade dos estudos neste complexo de espécies, sendo realizada uma revisão taxonômica deste grupo. Para este estudo, visando compreender a variabilidade morfológica destas espécies, foi efetuada uma extensa análise de coleções de Herbário, estudos das populações no campo, abrangendo a área de distribuição das respectivas espécies. Evidenciou-se um grande número de indivíduos com características intermediárias, não sendo possível reconhecer cada uma das espécies com base no conceito anterior adotado para identificação das espécies deste complexo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O posicionamento duvidoso de algumas espécies de *Aechmea* nos respectivos subgêneros é discutido por diversos autores com base nas análises das características morfológicas, em geral amplamente polimórficas, como em dados moleculares (Wendt, 1997; Faria *et al.*, 2004; Wanderley & Martins, 2007; Horres *et al.*, 2007; Schulte *et al.*, 2009; Sass & Specht, 2010). O grande polimorfismo morfológico evidente em *Aechmea* e a sobreposição de caracteres dificultam a taxonomia do gênero, sendo evidente a presença de complexos de espécies.

Apesar do padrão de inflorescência ser um importante caráter para reconhecer alguns subgêneros de *Aechmea*, em *Ortgiesia*, por exemplo, o mesmo deve ser utilizado com cautela para a separação de espécies. É comum a ocorrência de inflorescência simples a composta, com disposição densa a laxa das flores na mesma espécie. Outro caráter, a presença de apêndices petalinos, importante para separar gêneros em Bromeliaceae, é também variável em um mesmo gênero. Apesar de este caráter ser referido como constante em *Aechmea*, a forma e o tamanho destas estruturas podem ser importantes na separação de algumas espécies. Em *Ortgiesia*, a característica morfológica que mais chama a atenção é a assimetria das sépalas, padrão frequente no gênero, assim como a presença de um longo mucron apical nas sépalas. Esse varia amplamente de tamanho em *Ortgiesia*, o que pode ser confirmado com os resultados obtidos no presente trabalho.

As espécies *Aechmea coelestis*, *A. organensis* e *A. gracilis* caracterizam-se pelo hábito epifítico, terrestre ou rupícola, pelas folhas com margem forte a esparsamente serrada, algumas vezes com a porção basal interna arroxeadada e ápice arredondado, mucronado a mucronulado. A inflorescência varia desde simples a composta, com

poucas a numerosas flores. As sépalas são mucronadas e o ovário varia de subtrígono, trígono, cilíndrico ou clavado. As flores possuem sépalas rosa-claras até vermelhas e pétalas azul-claras até roxas. As principais características utilizadas na delimitação são o padrão de inflorescência, a morfologia do ovário, coloração das sépalas e pétalas e o comprimento do múcron das sépalas.

Smith & Downs (1979) consideraram *Aechmea organensis* distinta de *A. gracilis* principalmente pelo tamanho da flor: 15-20mm para *A. organensis* e 20-25mm para *A. gracilis*. E *A. coelestis*, com flores com cerca de 20mm, distinta de *A. gracilis* e *A. organensis* pela inflorescência com indumento alvo-foculoso persistente e com ramos retos. Também considerou o padrão de inflorescência, sendo que *A. coelestis* e *A. organensis* apresentam inflorescência composta e *A. gracilis* podendo apresentar inflorescência simples ou composta. Além das três espécies apresentarem pétalas azuis.

A difícil circunscrição de *Aechmea coelestis*, *Aechmea gracilis* e *Aechmea organensis* foi também notada por Wanderley & Martins (2007) durante a realização da monografia de Bromeliaceae para a Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo.

Entretanto, apesar da verificação pelas autoras de características morfológicas sobrepostas neste complexo e com proposta de estudos complementares para elucidação da taxonomia deste grupo de espécies, as três espécies foram reconhecidas conforme descrições a seguir. Na tabela 2 são apresentados os dados compilados na realização da presente revisão.

Aechmea coelestis, com plantas de maior porte, folhas mais largas, com margem serrilhada a espinescente, inflorescência robusta, pouco a muito ramificada, flores 20-26mm, com ovário e sépalas rosa-claras, ovário subtrígono e placenta ocupando a porção mediana do ovário. Com ocorrência predominante em ambientes de costão rochoso e floresta ombrófila densa próxima ao litoral.

Aechmea organensis, com plantas de porte menor, folhas com margem serrilhada, inflorescência geralmente ramificada na base, flores 21-29mm, com ovário e sépalas vermelho-alaranjadas ou vermelhas, ovário subtrígono e placenta ocupando mais da metade da extensão do ovário. Ocorre em floresta ombrófila densa de encosta, planalto e litorânea.

Aechmea gracilis, com plantas com porte similar ao de *A. organensis*, folhas com margem esparsamente serrilhada, inflorescência pouco ramificada até simples, flores 11-21mm, com ovário e sépalas rosa-magenta a rosa-claras, ovário clavado e placenta ocupando a porção mediana do ovário. Com distribuição semelhante à *A. organensis*.

A sobreposição de caracteres nesse grupo de espécies, onde o padrão de inflorescência pode variar de simples a composta, o comprimento das flores e o comprimento e largura das folhas em cada uma das espécies, torna difícil a delimitação das mesmas.

Esta variabilidade pode ser vista examinando plantas vivas e material de herbário que apresentam muitas variações morfológicas para cada um destes táxons, inclusive na mesma população, onde foi observada uma continuidade das características destes táxons, reforçando a necessidade de nova circunscrição para o grupo.

Considerando os resultados de amplo estudo de várias populações e de coleções de herbário, inclusive de materiais-tipo destes táxons, observou-se que, apesar dos mesmos serem úteis para a delimitação genérica e infragenérica, há uma grande plasticidade morfológica entre os táxons estudados no presente trabalho, revelando-se insuficientes para separação das espécies estudadas.

Verificou-se que as características diagnósticas utilizadas na separação destes táxons revelam que se trata de uma única espécie, cujas medidas referentes às estruturas florais, como comprimento de flor, sépalas e pétalas, múcron apical e comprimento do

lobo da sépala apresentam um contínuo ao longo das populações estudadas, não permitindo a manutenção das três espécies, sendo aqui proposta a sinonimização de *Aechmea gracilis* e *Aechmea organensis* em *Aechmea coelestis*, abrangendo então todo o espectro de variabilidade morfológica presente nos indivíduos deste grupo.

Aechmea coelestis (K. Koch) E. Morren, Fl. Serres Jard. Eur. 21: 5, t. 2146. 1875.

Hoplophytum coeleste K. Koch, Append. Pl. Nov. Hort. Berol. 1856: 6. 1857.

Aechmea organensis Wawra, Oesterr. Bot. Z. 30: 116. 1880. *Syn. nov.*

Aechmea gracilis **Erro! Indicador não definido.** Lindm., Kongl. Svenska Vetensk. Akad. Handl. 24(8): 30. 1891. *Syn. nov.*

Epífita, rupícola ou terrestre, 29-79 cm. **Roseta** infundibuliforme. **Folhas** 17,5-123 cm; bainha geralmente arroxeadas a atro-purpúreas, 3-12 cm larg., oblonga a elíptica; lâmina 1,5-9 cm larg., ligulada ou lanceolada, ápice arredondado a agudo, mucronado, margem esparsamente serrilhada a espinescente, espinhos, quando presentes, castanho-escuros, 1,1-1,8 mm. **Pedúnculo da inflorescência** verde a vináceo, 22-65 cm, esparsamente alvo-lanuginoso; brácteas verdes, róseas, avermelhadas ou vináceas, membranáceas, em geral as basais mais curtas que os entrenós e as superiores imbricadas, pouco vistosas, 1,5-9 cm, estreito-triangulares a lanceoladas, levemente lanuginosas, margem inteira, às vezes as inferiores serrilhadas, ápice mucronado. **Inflorescência** desde muito ramificada até 1/3 da raque, com poucas ramificações na base, mais raramente simples, com flores densa ou laxamente dispostas, ereta, 4-20 cm, cilíndrica, piramidal ou ovóide, alvo-lanuginosa (exceto as pétalas) a glabrescente; ramos com 1-10 flores, geniculados, patentes a suberetos; brácteas primárias verdes, róseas, avermelhadas ou vináceas, membranáceas, 1-8 cm, mais curtas a mais longas que os ramos, estreito-triangulares, ápice atenuado, mucronado. **Brácteas** florais verdes, róseas, avermelhadas

ou vináceas, membranáceas, 0,5-2 cm, estreito-triangulares a ovais, envolvendo menos de 1/2 do diâmetro do ovário, ápice longo-acuminado, margem inteira, ápice mucronado, livres. **Flores** patentes, sésseis, polísticas, 11-32 mm; sépalas rosa-claras, rosa-magenta até vermelhas, assimétricas, 4-12 mm, incluindo múcron com 0,8-7 mm, conatas na base 0,5-4mm; pétalas azul-claras, azul-arroxeadas ou roxas, alvas na base, eretas, 7-20 mm, espatuladas, ápice retuso, cuculado; apêndices petalinos basais, papilosos a curto-fimbriados ou ausentes; tubo epígino conspícuo; ovário clavado a subtrígono, em seção transversal subtrigonal a circular, óvulos dispostos na parte mediana do ovário até ao longo de quase toda a extensão do septo.

Aechmea coelestis foi primeiramente descrita em 1856 como *Hoplophytum coeleste* por K. Koch. Foi então combinada em *Hohenbergia coelestis* (K. Koch) Baker em 1871 e combinada novamente, em 1875, para o gênero *Aechmea*. O tipo designado é a ilustração do material usado para descrição, o qual foi cultivado na Europa, e a procedência do mesmo é duvidosa, sendo indicada como Sudeste do Brasil.

A obra de Smith & Downs (1979) apresenta duas variedades para a espécie, sendo elas *Aechmea coelestis* var. *coelestis* e *Aechmea coelestis* var. *albo-marginata*. A primeira corresponde ao *sensu lato* da espécie, sendo a segunda uma variedade com folhas listradas de branco, especialmente na margem. O material-tipo desta variedade é provindo de material cultivado de localização desconhecida, assim como a distribuição desse táxon também é desconhecida.

Aechmea organensis foi descrita por Wawra em 1880, tendo como localidade-tipo a Serra dos Órgãos, em Teresópolis, estado do Rio de Janeiro. Dessa localidade deriva o seu epíteto específico *organensis*. O material-tipo desta espécie encontrava-se depositado no herbário de Berlim, que foi parcialmente destruído durante a Segunda Guerra Mundial. Sendo assim, houve a lectotipificação da espécie, em 1979, por Smith

& Downs na monografia de Bromelioideae para a Flora Neotropica. Uma ilustração de Wawra datada de 1883 passou então a ser o tipo de *A. organensis*.

Aechmea gracilis, descrita em 1891 por Lindman, tem seu material-tipo depositado no herbário de Estocolmo e fotografias deste foram examinadas para o presente trabalho. O material-tipo e seu isótipo apresentam diferenças morfológicas e identificações duvidosas, já que este último apresenta uma planta com inflorescência de 2-3 ramos na base em comparação a uma inflorescência simples do holótipo, porém ambos foram posteriormente identificados como *Aechmea organensis* por L.B. Smith. Ou seja, a dificuldade de identificação evidencia a variabilidade morfológica destes táxons e a circunscrição problemática destas espécies. O holótipo de *A. gracilis* foi utilizado como base para a ilustração da espécie na monografia de Bromelioideae da Flora Neotropica, em 1979.

Além dos táxons incluídos neste complexo (*Aechmea gracilis*, *Aechmea organensis* e *A. coelestis*), *Aechmea caudata* Lindm. é uma espécie muito relacionada morfológicamente, possuindo muitas características em comum. Quando examinados em material seco, estes materiais podem ser confundidos, porém as flores diferem em coloração, apresentando *A. caudata* ovário e sépalas alaranjadas e pétalas amarelas, enquanto *A. coelestis* apresenta o ovário e sépalas rosa-claras a vermelhas e pétalas azul-claras a roxas. Portanto, em ambiente natural e durante o período de floração as plantas são facilmente identificadas.

MATERIAL EXAMINADO

PARANÁ - Adrianópolis: I. Isernhagen 328 (UPCB) **Antonina:** G. Hatschbach 12786 (UPCB) **Balsa Nova:** R. Kersten 969 (UPCB). **Caiobá:** R. Braga 1612 (UPCB), S.M. Silva (UPCB). **Curitiba:** A.C. Cervi 6654(UPCB), M. Borgo 927 (UPCB). **Guaraqueçaba:** G. Gatti 295(UPCB), G. Gatti 294 (UPCB). **Matinhos:** R. Morokawa 23 (UPCB), R. Morokawa 40 (UPCB), R. Morokawa 7 (UPCB). **Morretes:** F.C. Hoehne *s/n* (SP). M. Kuhlmann *s/n* (SP), M. Kaehler 1 (UPCB), M. Kaehler 61 (UPCB), M. Kaehler 96 (UPCB), G. Hatschbach (UPCB). **Paranaguá:** A.C. Barbosa *s/n* (UPCB), A.L.S. Gatti 208 (UPCB), C. Kozera 1408 (UPCB), C. Kozera 1463 (UPCB), R.M. Britez (UPCB). **Pinhais:** M.P. Petean 94 (UPCB), M.P. Petean 60 (UPCB). **Piraquara:** M. Reginato 166 (UPCB), M. Reginato 64 (UPCB), R. Kersten 734 (UPCB). **Tagaçaba:** C. Giongo 6 (UPCB). **SANTA CATARINA - Araguari:** M. Cacilda *s/n* (UPCB). **Itapoá:** R.R.B. Negrelle 901(UPCB), R.R.B. Negrelle 281 (UPCB). **SÃO PAULO - Barra do Turvo:** J.P. Souza 100 (SP), **Bertioga:** B.F. Abondanza 8 (SP), B.F. Abondanza 9 (SP), B.F. Abondanza 10 (SP), B.F. Abondanza 11 (SP), B.F. Abondanza 12 (SP), M.G.L. Wanderley 2466 (SP), M.G.L. Wanderley 2467 (SP), M.G.L. Wanderley 2468 (SP), S.E. Martins 884(SP). **Biritiba-mirim:** A. Custódio Filho 1768 (SP). **Cananéia:** F. de Barros 1572 (SP), M.G.L. Wanderley 249(SP), M.G.L. Wanderley 250(SP), M.G.L. Wanderley 515(SP), M.G.L. Wanderley 525(SP), M.G.L. Wanderley 723(SP), S.E. Martins 895(SP). **Cunha:** S.E. Martins 952(SP). **Capão Bonito:** L. Passos *s/n* (UEC). **Eldorado:** R.R. Rodrigues 129 (ESA), R.R. Rodrigues 133(ESA), V.C. Souza 9011 (SP). **Guapiara:** M. Kuhlmann *s/n* (SP) **Iguape:** F.C. Hoehne *s/n* (SP), I. Cordeiro 663(SP), M.C.H. Mamede 254(SP), S.A. Nicolau 1066 (SP), S.L. Proença 114 (SP), S.J. Gomes da Silva 047 (SP). **Ilhabela:**

M.G.L. Wanderley 2452 (SP). **Iporanga:** B.F. Abondanza 19 (SP), B.F. Abondanza 20 (SP), B.F. Abondanza 21 (SP), B.F. Abondanza 22 (SP), B.F. Abondanza 23 (SP), G.A.D.C. Franco 1425 (SP), M.G.L. Wanderley *s/n* (SP)M.G.L. Wanderley 2020 (SP). **Itaguá;** P.I.S. Braga 1672 (RB). **Itapecerica da Serra:** J. Mattos 11853 (SP). **Mogi das Cruzes:** M.G.L. Wanderley 205(SP), M.G.L. Wanderley 206 (SP). **Pariquera-açu:** B.F. Abondanza 13 (SP), B.F. Abondanza 14 (SP), B.F. Abondanza 15 (SP), B.F. Abondanza 16 (SP), G. Martinelli 15845 (RB), M. Sztutman 317 (ESA), S.E. Martins 914(SP), S.E. Martins 913(SP). **Peruíbe:** I. Cordeiro 1573(SP). **Ribeirão Grande:** G. Martinelli 15814 (RB), G. Martinelli 15832 (RB),M.G.L. Wanderley 2010 (SP), M.G.L. Wanderley 2453(SP), M.G.L. Wanderley 2454(SP), M.G.L. Wanderley 2442a (SP), M.G.L. Wanderley 2229 (SP), M.G.L. Wanderley 2004(SP), M.G.L. Wanderley 2242(SP). **Salesópolis:** L. Rossi 1657(SP). **São Luiz do Paratinga:** R.B. Louzada 97(SP). **São Miguel Arcanjo:** G. Martinelli 15772 (RB), G. Martinelli 15775 (RB), M. Sugiyama 1036 (SP). **São Paulo:** A. Gehrt *s/n* (SP), R. Doering *s/n* (SP). **São Vicente:** S.E. Martins 1072(SP). **Sete Barras:** M.G.L. Wanderley 2062(SP), M.G.L. Wanderley 2065(SP), P.H. Davis 60918 (SP). **Tapiraí:** B.F. Abondanza 3 (SP), B.F. Abondanza 4 (SP), B.F. Abondanza 5 (SP), B.F. Abondanza 6 (SP), P. Fratin *s/n* (SP), S.E. Martins 1284 (SP) **Ubatuba:** A. Furlan 1479 (SP), H.F. Leitão Filho *s/n* (UEC), M.A. de Assis 436 (SP), M.G.L. Wanderley 2444 (SP), M.G.L. Wanderley 2446(SP), M. Kuhlmann 4627 (SP), S.E. Martins 1073(SP). **RIO DE JANEIRO - Teresópolis:** B.F. Abondanza 17 (SP), B.F. Abondanza 18 (SP), M.R. Foster *s/n* (SP).

Tabela 1 – Localidades das coletas realizadas e coletores.

LOCALIDADE	COLETOR
SÃO PAULO - Tapiraí	S.E. Martins 1284
SÃO PAULO - Bertioga	M.G.L. Wanderley 2467
SÃO PAULO - Pariquera-Açu	B.F. Abondanza 13
SÃO PAULO - São Luís do Paraitinga	B.F. Abondanza 16
***RIO DE JANEIRO – Teresópolis	B.F. Abondanza 17
SÃO PAULO - Iporanga	B.F. Abondanza 23
SÃO PAULO - Ribeirão Grande	B.F. Abondanza 26
***SÃO PAULO – São Vicente	S.E. Martins 1072
SÃO PAULO - Ubatuba	M.G.L. Wanderley 2446

*** localidades do material-tipo

Tabela 2 – Características morfológicas utilizadas como padrão de delimitação na monografia de Bromeliaceae, em *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*.

Características morfológicas	<i>A. coelestis</i>	<i>A. organensis</i>	<i>A. gracilis</i>
Padrão da inflorescência	Composto	Composto a simples	Simple a composto
Tamanho da flor	20mm	25-30mm	15mm
Cor da sépala	Rósea	Vermelha a vinácea	Rósea
Cor da pétala	Azul claro	Azul a roxa	Azul a azul claro
Propagação em espiral	Ausente	Ausente	Presente

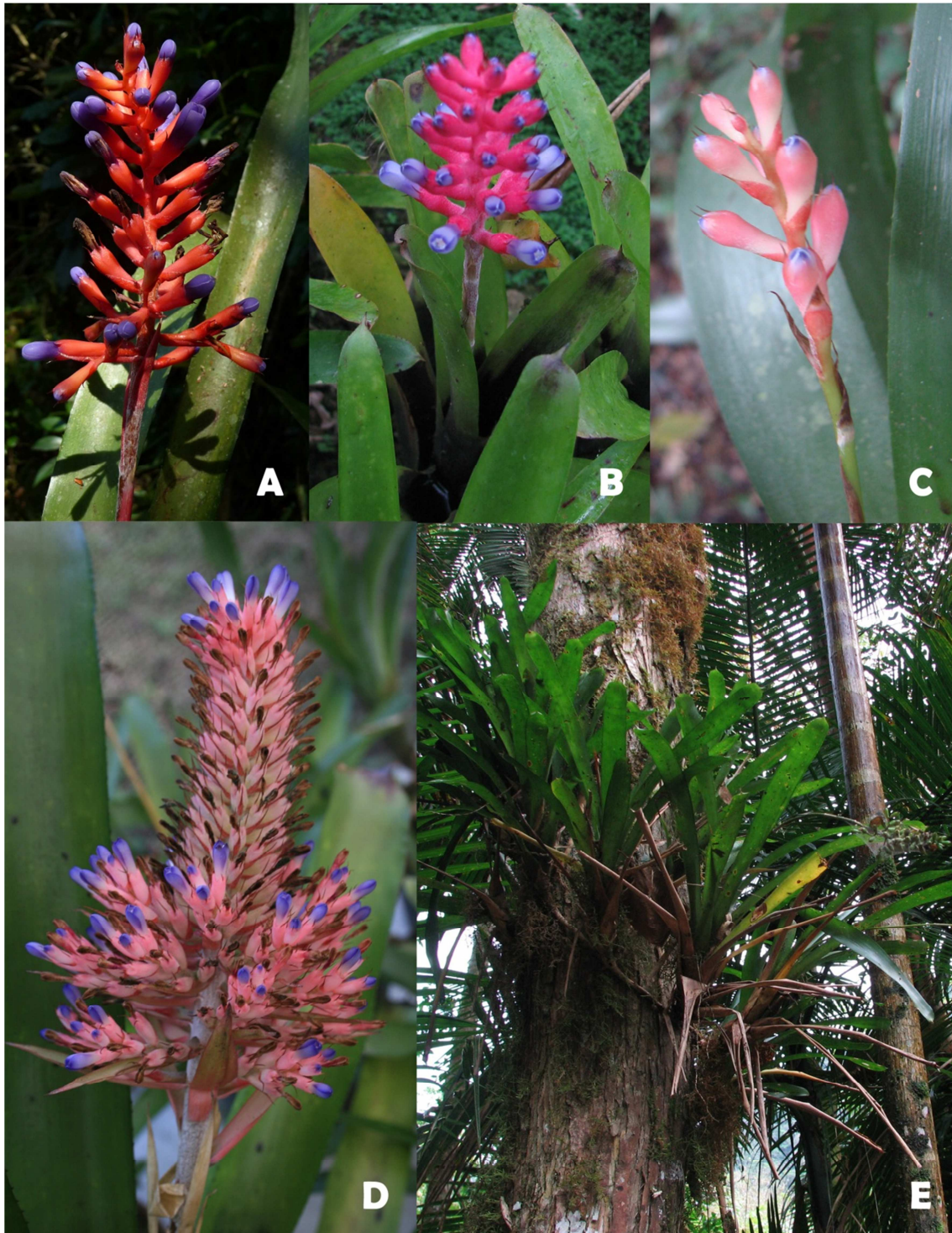


Figura 1 – Variação morfológica interpopulacional encontrada em inflorescências de *Aechmea coelestis*. Populações: **A**- Tapiraí, **B** – Iporanga, **C** – Bertiooga, **D** – Ubatuba. **E** representa a propagação vegetativa encontrada em algumas populações.

Fotos: A - S.E. Martins; B - B.F. Abondanza; C - C. Zanella; D – A. Tavares; E – B.F. Abondanza.

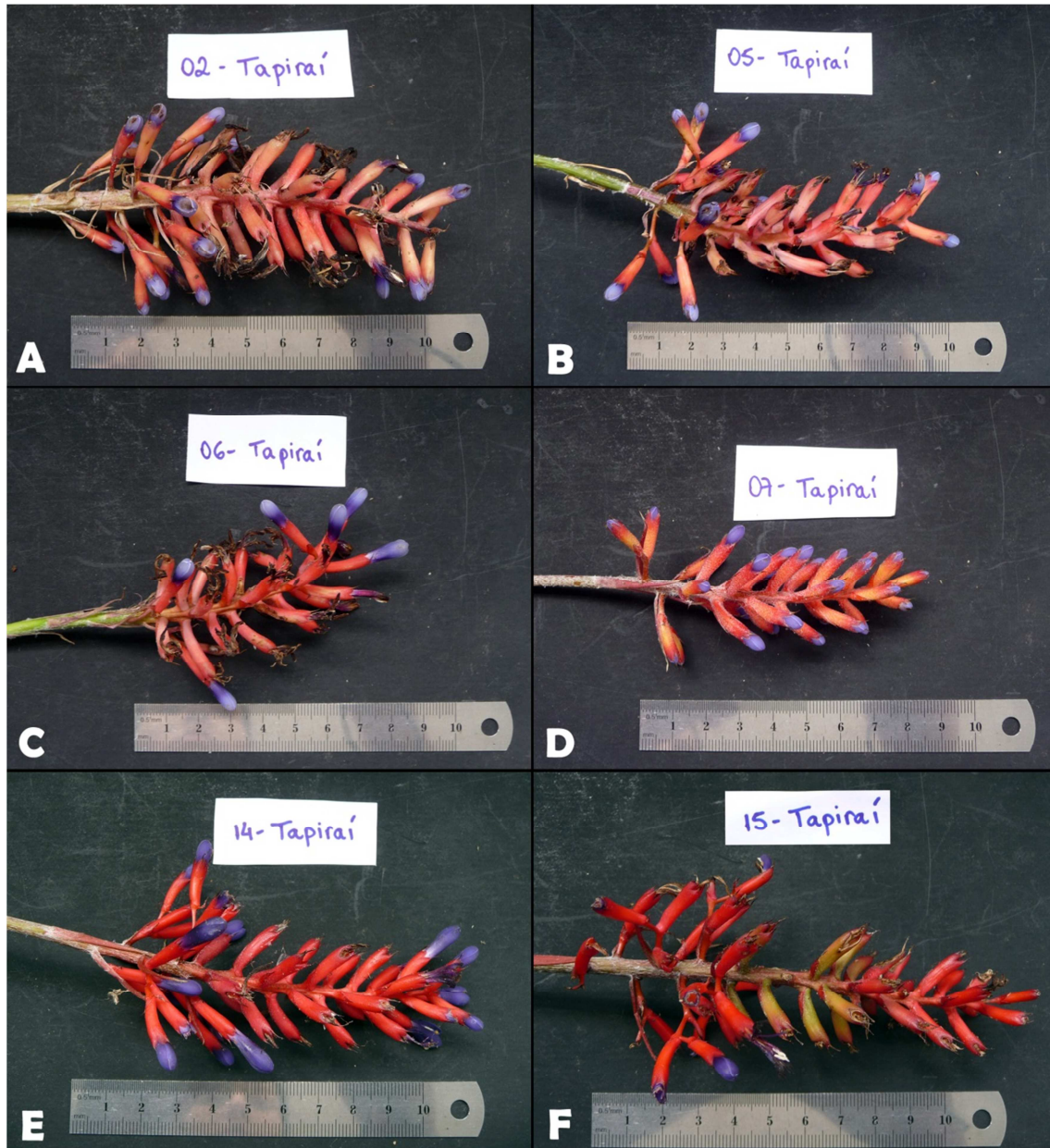


Figura 2 – Variação morfológica intrapopulacional encontrada em *Aechmea coelestis* na população de Tapiraí.

Fotos: A –F: B.F. Abondanza.

Capítulo II

*Genética de populações do complexo *Aechmea coelestis* (K. Koch) E. Morren (Bromeliaceae)*

INTRODUÇÃO

Bromeliaceae possui 3.172 espécies e é uma família quase exclusivamente neotropical de angiospermas (Luther, 2008; Smith & Downs, 1979). O Brasil é um dos principais centros de diversidade da família, e a região Sudeste detém cerca de 40% dos representantes da família. São plantas epífitas, rupícolas ou terrícolas, podendo se adaptar a diferentes ambientes e ecossistemas (Wanderley & Martins, 2007).

O gênero *Aechmea*, é o maior e mais diverso gênero da família Bromeliaceae (Faria *et al.*, 2004). Além disso, a Floresta Atlântica é o principal centro de diversidade do gênero, sendo a destruição antrópica desse bioma uma das principais causas de extinção das espécies de *Aechmea*, em adição ao extrativismo ilegal que ocorre por conta do potencial ornamental dessas plantas.

A estrutura genética de uma população reflete a interação de diferentes processos evolutivos, incluindo a história evolutiva da espécie, o sistema de cruzamento e as forças evolutivas: mutação, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (Slatkin, 1987). Estudos de genética de populações ampliam o conhecimento sobre estes processos, permitindo a realização de estudos de manejo e conservação (Cavallari, 2006) e até mesmo a delimitação de espécies, por meio de métodos de agrupamento de indivíduos de acordo com suas frequências alélicas e da avaliação de parâmetros como a subdivisão das populações (Shaffer & Thomson, 2007; Duminil & Michele, 2009).

Nesse contexto, marcadores nucleares de microssatélites, que são sequências repetitivas de pares de bases inseridas em regiões do genoma, podem ser informativos nas barreiras específicas. Isso se deve ao fato de serem marcadores codominantes e altamente polimórficos, e apesar de poderem apresentar homoplasias, este

inconveniente é facilmente resolvido com o estudo de múltiplos locos (Duminil & Michele, 2009).

O número de trabalhos que avaliem a diversidade genética de populações de bromélias vem crescendo nos últimos anos (Tabela 1). Atualmente há estudos para os gêneros *Alcantarea* (Barbará *et al.*, 2007/ a; 2008; 2009), *Bromelia* (Zanella, 2009), *Encholirium* (Cavallari *et al.*, 2006), *Pitcairnia* (Sarhou *et al.*, 2001, Domingues, *et al.*, 2011; Palma-Silva *et al.*, 2011), *Puya* (Sgorbati *et al.*, 2004), *Tillandsia* (Soltis *et al.*, 1987; González-Astorga *et al.*, 2004) e *Vriesea* (Alves *et al.*, 2004; Palma-Silva *et al.*, 2009). Para o gênero aqui estudado, já foram conduzidos estudos com quatro espécies: *Aechmea magdalenae* (Murawski e Hamrick, 1990) *Aechmea tuitensis* (Izquierdo e Piñero, 2000) *Aechmea fulgens* (Almeida, 2006) e *Aechmea winkleri* (Goetze, 2010), sendo que estas duas últimas são espécies endêmicas do Brasil.

A forma de vida (ausência ou presença de crescimento vegetativo), o sistema de cruzamento e a forma de dispersão de sementes influenciam diretamente na diversidade genética de uma espécie, sendo que espécies alógamas tendem a apresentar grande diversidade genética e pouca diferenciação genética entre suas populações (Hamrick & Godt, 1996). Não há estudos de biologia reprodutiva para este complexo de espécies, mas a espécie proximamente relacionada *Aechmea winkleri* apresenta-se como alógama, conforme demonstrado por Goetze (2010). Algumas espécies deste gênero são auto-compatíveis e apresentam a auto-fecundação como forma facultativa de reprodução (Matallana *et al.*, 2010; Scrok & Varassin, 2011).

Taxonomicamente, o complexo *Aechmea coelestis* (K. Koch) E. Morren é formado por três espécies: *A. coelestis*, *A. gracilis* e *A. organensis*, de variabilidade morfológica muito grande e de difícil circunscrição (Wanderley e Martins, 2007). Estas espécies compartilham suas áreas de distribuição, ocorrendo em ambientes de Mata

Atlântica, desde o estado do Paraná ao Espírito Santo. Podem apresentar hábito epífito, terrícola ou rupícola, havendo predominância de epifitismo, com exceção de *A. coelestis* que se mostra preferencialmente rupícola. As espécies florescem duas vezes ao ano, com períodos sobrepostos: *Aechmea coelestis* floresce em fevereiro e setembro, *A. gracilis* de maio a junho e de agosto a novembro e *A. organensis* em fevereiro e junho. Apresentam flores azuis ou violeta, com sépalas providas de longo múcron apical, e inflorescência que pode variar de simples a composta, com poucas a muitas ramificações na base (Wanderley & Martins, 2007). Nesse contexto, caracteres morfológicos se mostram insuficientes para a delimitação precisa dos táxons, sendo necessários estudos de genética de populações para melhor compreensão dos limites entre os mesmos.

METODOLOGIA

Coleta do material e extração de DNA

As coletas foram realizadas no período de março de 2010 a julho de 2011. No total, foram amostrados 186 indivíduos, de oito populações naturais ao longo da distribuição geográfica dos táxons estudados (Tabela 2 – Figura 1). A distância geográfica média entre as populações foi de 357,52 km, sendo que a menor distância encontrada entre duas populações foi de 39,1 km (IPO – PAR) e a maior distância encontrada foi de 1061,94 km (SGR – ESP). Uma amostra de folha de cada indivíduo foi desidratada e mantida em sílica gel até o momento da extração de DNA. Todos os indivíduos coletados foram georreferenciados.

O DNA genômico total foi extraído segundo o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações. A quantificação do DNA total foi realizada em espectrofotômetro BIOPHOTOMETER EPPENDORF®, seguindo o manual do fabricante e também através da visualização em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X e pré-corado com *Gel Red* (Biotium) e quantificados através do marcador ladder 100pb (PROMEGA), em que a banda de 500 pb apresenta 150ng de DNA.

Análises moleculares dos marcadores de microssatélites

Como no início do estudo não haviam disponíveis na literatura loci de microssatélites específicos para as espécies do gênero *Aechmea*, táxon alvo deste estudo, optou-se por duas estratégias de obtenção dos marcadores moleculares microssatélites (SSR): desenvolvimento de novos loci de microssatélites e otimização de loci heterólogos (ver apêndice).

Genotipagem e análise dos SSR

O total de sete loci de SSR: um loco desenvolvido *de novo* (Ao06) e seis loci de SSR heterólogos (PaC05, PaD07 - Paggi *et al* 2008, VgC01 – Palma-Silva *et al.* 2007, Acom12.12, Acom 78.4 e Acom82.2 - Wöhrmann e Weising, 2011) selecionados nas etapas anteriores foram amplificados em todas as amostras populacionais a partir do protocolo de amplificação descrito por Palma-Silva *et. al* (2007). Cada *primer Forward* foi sintetizado com uma cauda M13 de 19 pares de base (pb) (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') seguindo a metodologia descrito por Schuelke (2000). Os produtos de amplificação foram enviados para análise em sequenciador automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems), no laboratório de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP). Estes foram então analisados fazendo-se uso do software GENEMARKER® V1.97 (Softgenetics) com o auxílio de padrão de tamanho molecular conhecido LIZ (Applied Biosystems). Devido ao grande número de alelos encontrados, os loci Acom12.12, Acom 74.8, Acom 82.2 e Ao6 foram genotipados duas vezes para certificação dos resultados.

Análises estatísticas

A caracterização dos loci e os níveis de diversidade genética dentro das populações foram descritos através dos cálculos de: número de alelos por locus (A), riqueza alélica (R_s), variância do tamanho dos alelos (Var), heterozigose observada (H_o) e heterozigose esperada (H_e). Estes parâmetros foram calculados com auxílio do programa MSANALYSER V4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003). O programa GENEPOP V4.0.10 *WebProject* (Raymond & Rousset 1995, Rousset 2008) foi utilizado para testar os princípios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) dentro das populações.

A hipótese de diferenciação das populações devido a isolamento por distância foi realizada calculando-se a correlação das matrizes das distâncias genéticas e geográficas através do teste de Mantel padronizado (Sokal & Rohlf 1995), por meio do GENEPOP V4.0.10 *WebProject* (Raymond & Rousset 1995, Rousset 2008).

A estrutura genética populacional foi estimada utilizando análise Bayesiana implementada no programa STRUCTURE V2.3.3 (Pritchard et al. 2000), para inferir a probabilidade de designar indivíduos a determinados grupos genéticos (K) e a proporção de mistura dos indivíduos (Q). Utilizou-se o *admixture model* e um período de *burn in* de 250.000, por 1.000.000 de replicações e 10 iterações para cada K, com variação de 1 a 10. Para a seleção do número ideal de grupos genéticos (valor verdadeiro de K) foi utilizada a metodologia proposta por Evanno (2005), incorporada ao STRUCTURE HARVESTER WEB V0.6.92, programa utilizado para tal estimativa. Essa metodologia utiliza a estatística de ΔK baseada na taxa de mudança na probabilidade dos logaritmos de cada um dos grupos genéticos (K) sucessivos.

A estatística F (Weir & Cockerham, 1984), foi calculada para quantificar os níveis de variação alélica dentro e entre as populações e para inferir o grau de subdivisão das mesmas por meio do programa MSANALYSER V4.05. A análise molecular da variância (AMOVA) hierárquica foi realizada no programa ARLEQUIN V3.11 (Excoffier et al. 2005) para avaliar os padrões de distribuição da variação genética intra e interpopulacional, com cada modelo hierárquico sendo testado por 10.000 permutações. O fluxo gênico par a par entre as populações foi estimado pelo número de migrantes por geração $N_{em} = (1/F_{st}-1)/4$, sob suposição do equilíbrio entre mutação e deriva, conforme proposto por Wright (1949).

RESULTADOS

Análises moleculares

Desenvolvimento de novos loci de SSR

Dos 96 clones sequenciados, 24 possuíam repetições do tipo SSR. Destas, sequencias flanqueadoras puderam ser desenhadas para sete loci (Tabela 4). Os sete loci testados apresentaram amplificação positiva nas amostras de indivíduos de todas as populações. Porém, somente o locus Ao6 apresentou polimorfismo e padrão de análise desejável.

Otimização de loci heterólogos de marcadores microsatélites

Dos trinta e seis loci de microsatélites heterólogos testados, 33% (doze loci) mostraram resultado positivo para amplificação nas amostras das populações estudadas (ver Tabela 3). Destes, seis loci apresentaram polimorfismo e padrão de análise desejável (PaC05, PaD07 – Paggi *et al* 2008, VgC01 – Palma-Silva *et al.* 2007, Acom12.12, Acom 78.4 e Acom82.2 - Wöhrmann e Weising, 2011). Indicando um total de 16% de loci polimórficos.

Análises estatísticas

Diversidade genética

Para os sete loci de SSR genotipados, foram encontrados no total 185 alelos, com média 26,43 alelos, com variação de 14 (PaC05) a 51 (Acom 82.2) alelos por loco. Os valores médios de heterozigosidade observada e esperada por loco variaram de 0,297 a 0,705 e de 0,557 a 0,835 respectivamente. O coeficiente de endocruzamento médio (F_{IS}) foi alto em todos os loci variando de de 0,131 a 0,461. Todos os loci

apresentaram desvios altamente significantes ($p < 0,001$) do equilíbrio de Hardy-Weinberg devido ao déficit de heterozigotos (Tabela 5).

Altos índices de diversidade genética foram observados para as populações analisadas (Tabela 6). A riqueza alélica teve média de 5,89 e variou de 3,49 a 7,57. As heterozigosidades observadas tiveram média de 0,511 e variaram de 0,140 a 0,656, sendo que as heterozigosidades esperadas apresentaram média de 0,730 e variaram de 0,497 a 0,832. Os coeficientes de endocruzamento, variaram de 0,117 e 0,709. Todas as populações apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,001$) devido ao déficit de heterozigotos.

Estrutura genética

O resultado da análise Bayesiana no programa STRUCTURE indicou a presença de dois grupos genéticos distintos ($K=2$)(Figura 2), de acordo com a metodologia ΔK proposta por Evanno (2005)(Figura 3). No primeiro grupo estão inseridas as populações BER, PAR, IPO, SGR e INT. No segundo grupo, ficaram alocadas as populações TAP, UBA e ESP.

A análise de variância molecular (AMOVA) realizada com um modelo hierárquico baseado nos dois grupos genéticos obtidos através do programa STRUCTURE, detectou variação genética distribuída hierarquicamente, com uma maior diferenciação ocorrendo dentro de cada uma das populações (79,85 %), como esperado para espécies alógamas. Entre os dois grupos genéticos propostos, a porcentagem de variação, apesar de estatisticamente significativa ($P < 0,05$) foi baixa, com somente 5,75%. Entre populações, a variação genética encontrada foi de 14,41% (Tabela 7).

A correlação de Mantel entre distância genética (F_{st}) e geográfica (Km) foi significativa (Figura 4), sugerindo a presença de isolamento-por-distância ($r = 0,42$; $p >$

0,05). Este modelo, baseado na correlação entre as distâncias genéticas (F_{ST}) e geográficas (km), assume que o fluxo gênico ocorre localmente entre populações adjacentes, em populações distribuídas continuamente (Wright 1943).

As estimativas de fluxo gênico entre as populações, estimado pelo número de migrantes por geração, foi $> 1N_e m$, valor geralmente requerido para manutenção da coesão de uma espécie. Valores de fluxo gênico menores do que $1N_e m$ são muito baixos para prevenir diferenciação devido à deriva genética (Wright, 1931), a menos que o coeficiente de seleção ou o tamanho efetivo dos alelos favoráveis seja suficiente para manter a coesão das espécies (Morjan & Rieseberg 2004).

Quando foi feita a correlação par a par com os índices de F_{ST} e $N_e m$, os resultados indicaram um fluxo gênico moderado entre as populações, em média 1,46, com resultados variando entre 0,47 e 3,78, sendo que a população ESP apresentou os valores mais altos de F_{ST} (0,199 – 0,346) e o mais baixo número de migrantes por geração (0,47 – 1,00). Este resultado pode ser reflexo da localização geográfica da espécie, que é a mais distante de todo o grupo (610 km da população mais próxima - UBA).

DISCUSSÃO

Amplificação heteróloga

O potencial do sucesso de transferência de SSR nucleares heterólogos é normalmente relacionado com a distância filogenética entre os táxons testados. Em monocotiledôneas, o sucesso médio de amplificação é de 58% e o de polimorfismos de locus heterólogos é em média 27% (Barbará *et al.*, 2007/b). Além disso, para bromélias, estudos anteriores (Barbará *et al.*, 2007/ b, Palma-Silva *et al.*, 2007, 2009 e 2011; Paggi *et al.*, 2008, Wöhrmann e Weising, 2011), demonstraram que a amplificação de marcadores SSR heterólogos entre espécies proximamente relacionadas ocorre em índices maiores (em média 52%, considerando os trabalhos de Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008, Wöhrmann e Weising, 2011) dos que os evidenciados neste trabalho (33% em *Aechmea coelestis*). Da mesma forma, as taxas de polimorfismos na transferência heteróloga de SSR testados também foram baixas nas populações do complexo *A. coelestis* (16%). Estudos realizados com outras espécies da subfamília Bromelioideae (*Aechmea winkleri* - Goetze, 2010 e *Bromelia antiacantha*, Zanella, 2009), os autores também encontraram baixas taxas de amplificação e polimorfismo. O baixo sucesso de transferência de SSR nucleares heterólogos observado nestes estudos pode ser um reflexo do fato de que os táxons deste grupo (subfamília Bromelioideae) pertencem ao mais recente ramo da família Bromeliaceae (Givnish *et al.* 2004). Os marcadores de SSR testados foram desenvolvidos a partir de espécies bastante distantes filogeneticamente de *Aechmea* e *Bromelia* (subfamília Bromelioideae), como *Vriesea gigantea* e *Alcantarea imperialis* (Tillandsioideae - Palma-Silva *et al.*, 2007), e *Pitcairnia albiflos* (Pitcairnioideae - Paggi *et al.*, 2008).

Diversidade e estrutura genética de Aechmea coelestis

Altos níveis de diversidade genética foram observados para todos os locos e populações analisadas. Apesar do alto número de alelos encontrados em todas as populações e locos, com até 51 alelos por loco (Acom82.8), os valores de heterozigosidade esperada encontrados (0,730) foram muito próximos dos valores observados em trabalhos realizados anteriormente e que tiveram por metodologia a utilização de marcadores nucleares do tipo SSR. Além disso, a diversidade genética encontrada nas populações do complexo *A. coelestis* condiz com os valores descritos para espécies de ampla distribuição em ambientes contínuos (floresta), como *B. antiacantha*, espécie poliplóide da subfamília Bromelioideae, em que o valor médio de heterozigosidade esperada foi de 0,750 (Zanella, 2009) e em *Vriesea gigantea*, espécie amostrada em 13 populações ao longo da Floresta Atlântica, o valor de heterozigosidade esperada foi de 0,714 (Palma-Silva *et al.* 2009). A extensão da área de distribuição de uma espécie tem grande influência sobre o nível de variabilidade da mesma. Espécies com distribuição regional, relativamente restrita, tem níveis de variação intermediária, enquanto espécies com distribuição geográfica ampla são as que normalmente apresentam maior variabilidade genética intrapopulacional (Cavalli & Winge, 2003).

Para espécies de distribuição restrita, como as que ocorrem em *inselbergs*, ambientes considerados ilhas terrestres funcionais, é esperado encontrar menores índices de diversidade genética em suas populações. De fato, menor diversidade genética foi observada para várias bromélias que ocorrem em *inselbergs*: *Alcantarea imperialis* ($H_e = 0,615$), *A. geniculata* (0,429) (Barbará *et al.*, 2007), *A. glaziouana* (0,472) e *A. regina* (0,523) (Barbará *et al.*, 2009). Em estudo realizado com a espécie *Pitcairnia geykesii*, com 14 populações de *inselbergs*, foi encontrado um valor de H_e igual a 0,325 (Sarhou *et al.*, 2001). No estudo mais recente feito para a família, Palma-

Silva *et al.* (2011) estudaram duas espécies também de *inselbergs*, *Pitcairnia albiflos* e *Pitcairnia staminea*, encontrando valores de H_e equivalentes a 0,429 e 0,452, respectivamente.

Estudos de diversidade genética foram realizados para espécies do gênero *Aechmea*, de distribuição geográfica restrita, utilizando tanto marcadores SSR (*A. winkleri* - Goetze, 2010), como com marcadores de isoenzimas (*A. magdalenae* - Murawski e Hamrick, 1990; *A. tuitensis* - Izquierdo e Piñero, 2000). Apesar dos valores de H_e entre as duas metodologias não serem comparáveis, todos os trabalhos mostraram altos índices de variação genética, maiores do que o esperado para espécies de distribuição regional (Hamrick & Godt, 1996). Para *A. winkleri*, espécie endêmica do Rio Grande do Sul e também do subgênero *Ortigiesia*, o valor médio de H_e foi de 0,63 (Goetze, 2010). Estudos com *A. tuitensis* (Izquierdo e Piñero, 2000), espécie endêmica do México, e *A. magdalenae* (Murawski e Hamrick, 1990), espécie de ocorrência limitada à República do Panamá, foram encontrados para ambas as espécies o valor médio de $H_e = 0,12$. O valor médio de H_e , considerando somente marcadores de isoenzimas, reportado para espécies de distribuição restrita foi de 0,08 (Hamrick & Godt, 1996).

Os coeficientes $F_{IS} = 0,295$ e o $F_{IT} = 0,408$ indicaram um elevado efeito de endogamia nas populações e/ou subdivisão entre as mesmas. Não existem estudos da biologia reprodutiva de *A. coelestis*, porém a autocompatibilidade é uma característica evidenciada em muitas bromélias (Martinelli, 1997; Siqueira Filho & Machado, 2001; Wendt *et al.*, 2001) inclusive no gênero *Aechmea*. Em estudo realizado com *Aechmea lindenii* foi evidenciado que a espécie é auto compatível e a formação de sementes férteis por auto fecundação é de 80%, porém a fecundação cruzada ainda é o sistema de cruzamento preferencial da espécie (Lenzi *et al.*, 2005). Resultados semelhantes quanto

ao modo de reprodução foram obtidos com *Aechmea distichantha*, também considerada auto compatível, capaz de realizar autofecundação na ausência de polinizadores, apresentando grande sucesso reprodutivo com fecundação cruzada, especialmente quando exposta ao sol (Scrok & Varassin, 2011). Neste caso, o modo de reprodução da espécie foi considerado misto, ou seja, a espécie apresenta reprodução sexuada com certa taxa de autofecundação facultativa.

Altos índices de estruturação populacional foram observados ($F_{ST} = 0,168$). Este valor de estruturação populacional está de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores realizados com bromélias, de sistemas de cruzamento misto ou cruzado (Hamrick & Godt, 1996). O para *Aechmea winkleri* o F_{ST} médio foi igual a 0,08 (Goetze, 2010), espécie que é autoincompatível; *Vriesea gigantea* apresentou $F_{ST} = 0,210$ (Palma-Silva *et al.*, 2009), sendo que esta é uma espécie de sistema de cruzamento misto; em espécies de *Alcantarea* de cruzamento misto ou cruzado, os resultados foram semelhantes: *Alcantarea imperialis* $F_{ST} = 0,434$, *A. geniculata* $F_{ST} = 0,111$ (Barbará *et al.*, 2007), *A. geniculata* $F_{ST} = 0,217$ *A. regina* $F_{ST} = 0,195$ (Barbará *et al.*, 2008)

Os modos de dispersão de sementes e dispersão de pólen constituem os componentes que determinam o fluxo gênico em plantas (Loveless & Hamrick, 1984). Há somente um estudo realizado para o complexo *A. coelestis* acerca de sua biologia de polinização, indicando que beija-flores são os principais visitantes e atuam na polinização (Machado & Semir, 2006). Porém, há relatos de polinização também por insetos, como abelhas e borboletas em espécies de flores pequenas, como *A. coelestis* (*A. distichantha* – Scrok & Varassin, 2011; *A. lindenii* – Lenzi *et al.*, 2005, *A. nudicaulis* – Schmid *et al.*, 2010), indicando inclusive que as abelhas podem ter um papel fundamental na formação de frutos e sementes viáveis (*A. caudata* - Kamke *et al.*,

2011). Muitas espécies de *Aechmea* possuem suas sementes frequentemente dispersas por pássaros, considerados bons dispersores de sementes. (Benzing, 2000) Apesar de estes padrões serem frequentemente observados nas espécies do gênero, estudos de biologia reprodutiva são indispensáveis para melhor compreensão dos padrões de fluxo gênico e estrutura populacional observados entre os táxons do complexo *A. coelestis*.

A pronunciada estruturação populacional observada em *A. coelestis* pode ser confirmada por meio da análise genética Bayesiana (STRUCTURE), em que a divisão populacional é aparente, com a presença de cinco agrupamentos genéticos. É importante notar que apesar de a estatística ΔK ter determinado o número de grupos mais provável como $K=2$, o fato de as populações apresentarem isolamento por distância e altos coeficientes de endocruzamento, faz com que o programa seja incapaz de determinar o K mais correto para o cenário real da espécie. Neste caso, seguindo instruções do autor da análise (Pritchard, 2000), deve-se realizar uma interpretação dos resultados e selecionar, dentre os agrupamentos, aquele que melhor corresponde à estrutura das populações analisadas e que tem maior sentido biológico.

A população ESP, que é a mais distante geograficamente de todo o grupo (610 km da população mais próxima - UBA), apresentou o menor índice de diversidade genética, o maior coeficiente de endocruzamento e maior diferenciação populacional. Este resultado é reflexo da diminuição na capacidade de dispersão da população, devido à distância geográfica, o que pode levar à diminuição do fluxo gênico e, por consequência, causar a divergência da população por deriva genética (Freeland, 2007). Populações de margem, como ESP, tendem a apresentar menor diversidade genética, maior diferenciação das outras populações, menor tamanho populacional efetivo e fluxo gênico reduzido (Soule 1973; Lammi *et al.* 1999). Com o aumento do isolamento das populações, a deriva genética apresenta uma influência maior do que o fluxo gênico e a

diferenciação das populações deve se tornar maior. Esse padrão de diminuição de fluxo gênico e de diversidade genética e maior diferenciação com relação às outras populações foi encontrado nas populações marginais de *Vriesea gigantea* (Palma-Silva *et al.*, 2009). Infelizmente essa população não foi analisada quanto a sua morfologia, o que não nos permite afirmar se se trata de um novo táxon, sendo necessárias análises futuras para exclusão/inclusão dessa população no complexo *A. coelestis*.

Delimitação taxonômica de Aechmea coelestis

O gênero *Aechmea* se encontra em uma das mais recentes linhagens da família Bromeliaceae, tendo divergido a cerca de cinco milhões de anos (Givnish *et al.*, 2004). Com o passar do tempo, os atributos que as espécies mantêm se modificam, e então a facilidade com que as suas linhagens podem ser descobertas e delimitadas aumenta (de Queiroz, 1998). Ao contrário de *Aechmea*, táxons mais antigos já acumularam uma amplitude de caracteres, incluindo isolamento reprodutivo, apomorfias e monofilia, que facilitam a delimitação das espécies. Ou seja, táxons recentes e que ainda estão passando por processo de especiação não apresentam estas características desenvolvidas e sua delimitação se mostra como um desafio. Nesse contexto, as informações genômicas podem colaborar com a delimitação taxonômica desses táxons que, provavelmente, ainda estão no começo de seu processo de diversificação (Shaffer & Thomson, 2007).

As populações aqui estudadas agruparam-se em dois *clusters* genéticos distintos, quando submetidas à análise Bayesiana do programa STRUCTURE. O primeiro grupo foi constituído das populações BER, PAR, IPO, INT e SGR e o segundo por TAP, UBA e ESP. O segundo grupo contém a população ESP, que mais difere das demais, por apresentar os maiores diferenciação genética e menor fluxo gênico. O programa

STRUCTURE agrupa os indivíduos com base em suas frequências alélicas, desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e proporção de mistura. Dessa forma, indivíduos são alojados em diferentes grupos, caracterizados por um conjunto de frequências alélicas em cada locus (Pritchard *et al.*, 2000; Corander *et al.*, 2003; Francois *et al.*, 2006). Embora tenha sido desenvolvido para reconhecimento de populações, este programa tem se mostrado útil em diversos estudos de delimitação de espécies em estado inicial de diversificação (Shaffer & Thomson, 2007). Em estudo, que teve por objetivo avaliar o desempenho de diferentes *softwares* de agrupamento por análise Bayesiana em condições de pequena diferenciação populacional, o programa STRUCTURE determina indivíduos aos seus grupos com 97% de precisão, quando o $F_{ST} \geq 0,05$. Porém, este programa não deve ser utilizado como único método de análise para delimitação de espécies (Duminil & Michele, 2009), e as conclusões com relação à delimitação de espécies foram baseadas na relação entre o agrupamento das populações, a proporção de variação entre os grupos criados e entre as populações e resultados morfológicos.

A proporção de variação, calculada pela AMOVA, entre os dois grupos obtidos a partir da análise Bayesiana foi muito pequena, apenas 5,75%, valor considerado baixo para suportar a presença de duas espécies distintas. Em estudos anteriores que consideraram mais de uma espécie, a porcentagem de variação ao nível de espécies se apresentou maior do que a encontrada aqui. Por exemplo, em estudo conduzido com duas espécies, *Alcantarea imperialis* e *A. geniculata*, os resultados obtidos pela AMOVA mostraram que a porcentagem de diferenciação entre as espécies foi de 28% (Barbará *et al.*, 2007). Posteriormente, Barbará *et al.*, (2009) encontraram variação de 16% entre as espécies *Alcantarea regina* e *A. glaziouana*. Duas espécies de Malvaceae, *Iliamna corei* e *Iliamna remota*, foram analisadas de acordo com sua estrutura e

diversidade genética e a análise de variância molecular evidenciou uma diferença de 16% entre as espécies (Bodo-Slotta & Porter, 2006).

Quando somados os resultados moleculares aos morfológicos, eles estão de acordo e se complementam. Não há suporte para a existência de mais de uma espécie. Morfológicamente, os táxons apresentam variações em suas características a nível populacional, não sendo possível encontrar caracteres diagnósticos que corroborem com a classificação atual destes táxons ou que permitam delimitar mais de uma espécie sem haver sobreposição de características. Além disso, em nenhum dos agrupamentos resultantes da análise Bayesiana podemos encontrar correspondência com agrupamentos taxonômicos atuais, ou grupos definidos de morfologia semelhante. No cenário de $K=2$, as populações agrupadas foram TAP, UBA e ESP, sendo que as duas últimas correspondem a táxons atualmente circunscritos em *A. coelestis*. A população TAP, porém, é composta por táxons de circunscrição até o momento indefinida e características morfológicas que não permitiriam sua inclusão em *A. coelestis*, se mantidos os limites atuais desta. Mesmo quando considerado $K=5$, a população TAP ainda apresenta similaridade com a população ESP, demonstrando que a delimitação atual das espécies, definitivamente, não pode ser relacionada com a estruturação real das populações, sendo assim considerada uma classificação artificial. Já a população SGR, que em ambos cenários, $K=2$ e $K=5$, apresenta-se homogênea e com correspondência de todos os indivíduos ao mesmo agrupamento, é composta por duas espécies distintas, se considerada a classificação atual. Esta é uma evidência de que os caracteres morfológicos utilizados para delimitação das espécies apresentam grande polimorfismo, muito provavelmente devido a adaptações locais ao ambiente. Dessa forma, os dados obtidos, tanto morfológicos quanto moleculares, corroboram a delimitação mais inclusiva, que abranja todo o espectro de variação morfológica e genética desses táxons.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam uma alta diversidade genética em todas as populações analisadas e estrutura populacional moderada/alta. Os altos valores de coeficiente de endocruzamento indicam que a espécie possui altos índices de endogamia e/ou subdivisão entre as populações. Além disso, os resultados não estão de acordo com a classificação taxonômica atual do complexo *Aechmea coelestis*, que reconhece três espécies: *A. organensis*, *A. gracilis* e *A. coelestis*. Não existem evidências para serem consideradas espécies distintas, já que a diferenciação entre populações é mais pronunciada do que a diferenciação entre os dois grupos genéticos bayesianos.

TABELAS

Tabela 1 – Principais trabalhos de genética de populações em Bromeliaceae

Espécies	Marcadores	Distribuição da espécie	Autores	Ano
<i>Tillandsia</i> spp	Aloenzimas	Ampla	Soltis <i>et al.</i>	1987
<i>Aechmea magdalenae</i>	Aloenzimas	Restrita	Murawski & Hamrick	1990
<i>Aechmea tuitensis</i>	Aloenzimas	Restrita	Izquierdo & Piñero	2000
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	Aloenzimas	Restrita	Sarthou <i>et al.</i>	2001
<i>Tillandsia achyrostachys</i>	Aloenzimas	Restrita	Gonzales- Astorga <i>et al.</i>	2004
<i>Vriesea friburgensis</i>	Aloenzimas	Ampla	Alves <i>et al.</i>	2004
<i>Puya raimondii</i>	AFLP	Restrita	Sgorbati <i>et al.</i>	2004
<i>Encholirium</i> spp.	RAPD	Restrita	Cavallari <i>et al.</i>	2006
<i>Alcantarea</i> spp.	SSR	Restrita	Barbará <i>et al.</i> ,	2007
<i>Alcantarea</i> spp.	SSR	Restrita	Barbará <i>et al.</i>	2008
<i>Alcantarea</i> spp.	SSR	Restrita	Barbará <i>et al.</i>	2009
<i>Vriesea gigantea</i>	SSR e cpSSR	Ampla	Palma-Silva <i>et al.</i>	2009
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	SSR	Restrita	Bosselier-Dubayle <i>et al.</i>	2010
<i>Pitcairnia albiflos</i>	RAPD	Restrita	Domingues <i>et al.</i>	2011
<i>Bromelia antiachanta</i>	SSR	Ampla	Zanella <i>et al.</i>	2011
<i>Pitcairnia</i> spp.	SSR e cpSSR	Restrita	Palma-Silva <i>et al.</i>	2011

Tabela 2 – Populações utilizadas no estudo. ID= nome da população, N= número amostral. * = Material cedido pela Msc. Márcia Goetze.

Localidade	Estado	ID	Latitude	Longitude	N
Bertioga	SP	BER	23S 51' 17"	46W 08' 18"	22
Pariquera-Açu	SP	PAR	24S 42' 55"	47W 52' 52"	11
Iporanga	SP	IPO	24S 35' 09"	48W 35' 35"	21
Serra da Graciosa*	PR	SGR	25S 20' 31"	48W 53' 36"	50
Ribeirão Grande	SP	INT	24S 05' 58"	48W 21' 54"	28
Tapiraí	SP	TAP	24S 02' 25"	47W 40' 11"	17
Ubatuba*	SP	UBA	23S 26' 03"	45W 04' 15"	21
Santa Teresa *	ES	ESP	19S 56' 09"	40W 36'	16

Tabela 3 - Teste de amplificação heteróloga: *primers* testados e resultado da amplificação: "+"= amplificação positiva, "-" = amplificação negativa. Os resultados de amplificação foram iguais para todas as populações

Primer	Amplificação em <i>Aechmea coelestis</i>	Autor	Espécie alvo	Subfamília
Acom12.12	+	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom22.22	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom64.22	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom67.2	+	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom68.3	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom71.3	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom74.2	+	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom82.8	+	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom86.4	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom91.2	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom93.4	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom101.1	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom109.6	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom117.15	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
Acom119.1	-	Wöhrmann e Weising,2011	<i>Ananas comosus</i>	Bromelioideae
AW1	-	Goetze, 2010	<i>Aechmea winkleri</i>	Bromelioideae
AW2	-	Goetze, 2010	<i>Aechmea winkleri</i>	Bromelioideae
AW3	-	Goetze, 2010	<i>Aechmea winkleri</i>	Bromelioideae
AW4	+	Goetze, 2010	<i>Aechmea winkleri</i>	Bromelioideae
AW5	+	Goetze, 2010	<i>Aechmea winkleri</i>	Bromelioideae
AW6	+	Goetze, 2010	<i>Aechmea winkleri</i>	Bromelioideae
PaD07	+	Paggi <i>et al.</i> , 2008	<i>Pitcairnia albiflos</i>	Pitcairnioideae
PaC05	+	Paggi <i>et al.</i> , 2008	<i>Pitcairnia albiflos</i>	Pitcairnioideae
PaZ01	-	Paggi <i>et al.</i> , 2008	<i>Pitcairnia albiflos</i>	Pitcairnioideae
PaA10	-	Paggi <i>et al.</i> , 2008	<i>Pitcairnia albiflos</i>	Pitcairnioideae
Pit8	-	Sarthou <i>et al.</i> 2003	<i>Pitcairnia geykesii</i>	Pitcairnioideae
VgA04	+	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2007	<i>Vriesea gigantea</i>	Tillandsioideae
VgB12	+	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2007	<i>Vriesea gigantea</i>	Tillandsioideae
VgC01	+	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2007	<i>Vriesea gigantea</i>	Tillandsioideae
VgF01	-	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2007	<i>Vriesea gigantea</i>	Tillandsioideae
Ai403	-	Palma-Silva <i>et al.</i> , 2007	<i>Alcantarea imperialis</i>	Tillandsioideae
E19	-	Boneh <i>et al.</i> , 2003	<i>Tillandsia fasciculata</i>	Tillandsioideae
E6	-	Boneh <i>et al.</i> , 2003	<i>Tillandsia fasciculata</i>	Tillandsioideae
E6B	-	Boneh <i>et al.</i> , 2003	<i>Tillandsia fasciculata</i>	Tillandsioideae
P2P19	-	Boneh <i>et al.</i> , 2003	<i>Tillandsia fasciculata</i>	Tillandsioideae

Tabela 4 – Locus SSR desenvolvidos para *Aechmea coelestis*. Pb = pares de base.

Primer	Motivo Repetição	Sequência Forward	Sequência Reverse	Tamanho (pb)
Ao2	TA e CA	ATTGGGCCCTTACTCTCCAC	CCTCCCCCTACTCCACCTAC	208
Ao3	CT	CCCCGAGAGTGTTTAATTGC	GACGTTTGTACGGCCTGTTT	232
Ao5	CT	AGCACTCGGAAAGGGAAAGT	GGAAGGAGGAGTCTGTGTGC	215
Ao6	CA	TGCCCTTCATGAGGTAAACA	GGGTATCTAAGGCTTTTCCA	158
Ao10	CT e CA	ATGTGGGGTTTTTGTGAGGA	AAACACCATTTAAAGGCCAAAA	246
Ao13	CT e CA	TTTTTCCCTTTTCTCCGAAT	TCCTTGGGATTCTTTTTGC	247
Ao18	CT e CA	ATGTGGGGTTTTTGTGAGGA	AAACACCATTTAAAGGCCAAAA	246

Tabela 5 – Caracterização genética e resumo da estatística *F* para os sete lócus de SSR analisados em oito populações de *Aechmea coelestis*. N = tamanho da amostra, A= número de alelos, Rs = riqueza alélica, Var = variância no tamanho do alelo, H_o = heterozigosidade observada, H_e = heterozigosidade esperada, F_{IT} = coeficiente total de endogamia, F_{ST} = índice de fixação e F_{IS} = coeficiente de endocruzamento.

Locus	N	A	Rs	Var	H_o	H_e	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
PaC05	144	14	3,051	9,110	0,347	0,557	0,603	0,309	0,426 ***
VgC01	154	38	10,362	53,987	0,705	0,817	0,221	0,104	0,131 ***
PaD07	155	15	4,432	8,138	0,297	0,634	0,571	0,205	0,461 ***
Acom12.12	170	23	9,064	20,254	0,556	0,732	0,341	0,123	0,249 ***
Acom78.4	156	21	10,438	12,007	0,530	0,797	0,402	0,133	0,311 ***
Acom82.8	182	51	15,589	161,046	0,635	0,835	0,350	0,129	0,254 ***
Ao6	175	23	7,432	20,052	0,508	0,735	0,369	0,173	0,237 ***
Total/Média	1136	185	8,624	40,656	0,511	0,730	0,408	0,168	0,295 ***

*** p < 0,001

Tabela 6 – Diversidade genética das populações de *Aechmea coelestis* para os sete locos de SSR. N = tamanho da amostra, A= número de alelos, Rs = riqueza alélica, Var = variância no tamanho do alelo, H_o = heterozigosidade observada, H_e = heterozigosidade esperada e F_{IS} = coeficiente de endocruzamento.

População	N	A	Rs	Var	Ho	He	Fis
BER	22	42	5,615	54,253	0,656	0,756	0,117 ***
PAR	11	30	6,295	51,054	0,533	0,766	0,197 ***
IPO	21	52	6,339	53,341	0,563	0,785	0,285 ***
SGR	50	83	7,571	35,640	0,608	0,832	0,265 ***
INT	28	63	6,292	44,572	0,543	0,774	0,309 ***
TAP	17	57	6,641	28,724	0,546	0,779	0,258 ***
UBA	21	39	4,909	43,993	0,499	0,649	0,253 ***
ESP	16	29	3,489	13,674	0,140	0,497	0,709 ***
Total/Média	186	395	5,894	40,656	0,511	0,730	0,299 ***

*** p < 0,001

Tabela 7 – Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) para *Aechmea coelestis*

Fonte da variação	Microsatélites nucleares		
	Varição %	Estatística F	Valor - p
<i>Três níveis</i>			
Entre grupos	5,75	FCT = 0,057	< 0.001
Entre populações do mesmo grupo	14,41	FSC = 0,153	< 0.001
Dentro das populações	79,85	FST = 0.202	< 0.001

Tabela 8 – Divergência genética (F_{ST} =- abaixo da diagonal) e fluxo gênico ($N_e m$ – acima da diagonal) para os pares de populações de *Aechmea coelestis*.

Populações	BER	PAR	IPO	SGR	INT	TAP	UBA	ESP
BER	-	1,69	1,19	1,85	1,25	1,46	0,69	0,65
PAR	0,128	-	1,76	2,46	1,83	2,27	1,10	0,54
IPO	0,174	0,124	-	2,69	3,67	1,21	0,72	0,70
SGR	0,119	0,092	0,085	-	2,25	3,78	1,01	1,00
INT	0,166	0,120	0,064	0,100	-	1,39	0,88	0,70
TAP	0,147	0,099	0,172	0,062	0,153	-	0,94	0,84
UBA	0,266	0,185	0,258	0,198	0,220	0,211	-	0,47
ESP	0,279	0,317	0,264	0,199	0,262	0,228	0,346	-

Figura 1

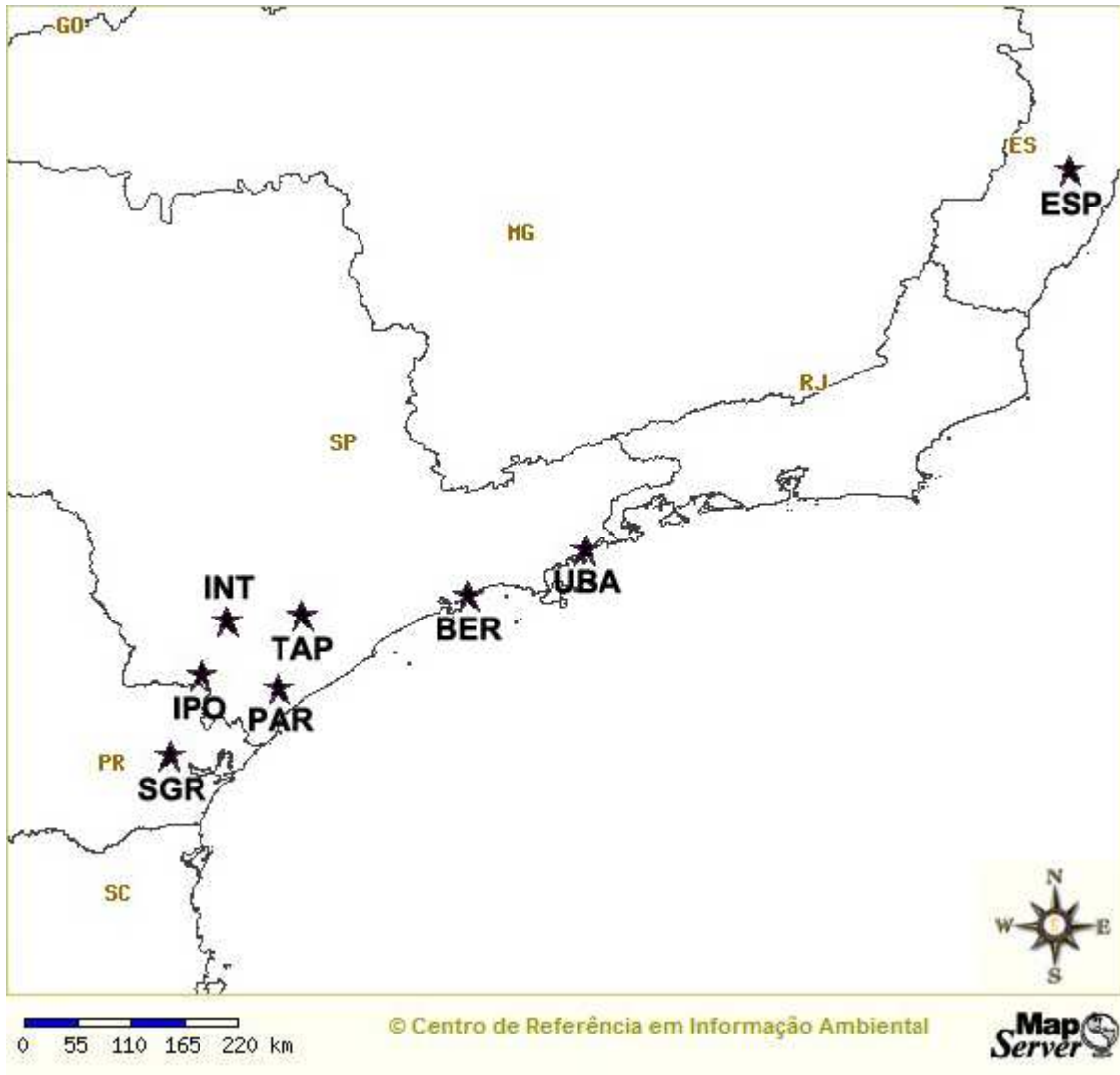


Figura 1 – Mapa com a localização das oito populações amostradas.

Populações: SGR: Serra da Graciosa (PR), PAR: Pariquera-Açu (SP); IPO: Iporanga (SP), INT: Intervales (SP), TAP: Tapiraí (SP), BER: Bertioga (SP), UBA: Ubatuba (SP) e ESP: Espírito Santo (ES).

Figura 2

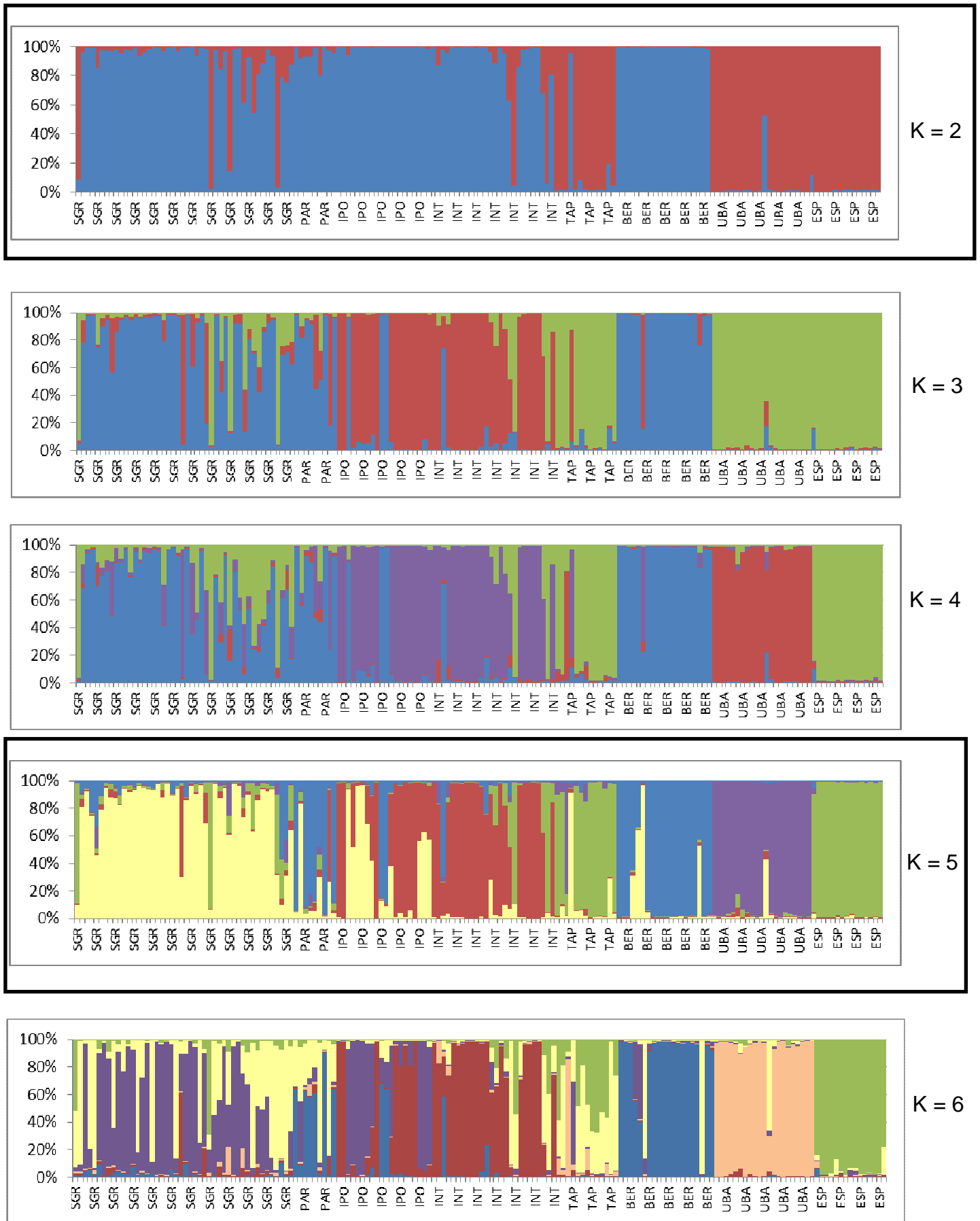


Figura 2 – Probabilidades de atribuição Bayesianas (valor de Q) de indivíduos de *Aechmea coelestis* para modelos populacionais de diversos K. Cada grupo genético (K) está indicado por uma cor diferente. Para sigla das populações veja legenda da Figura 1.

Figura 3

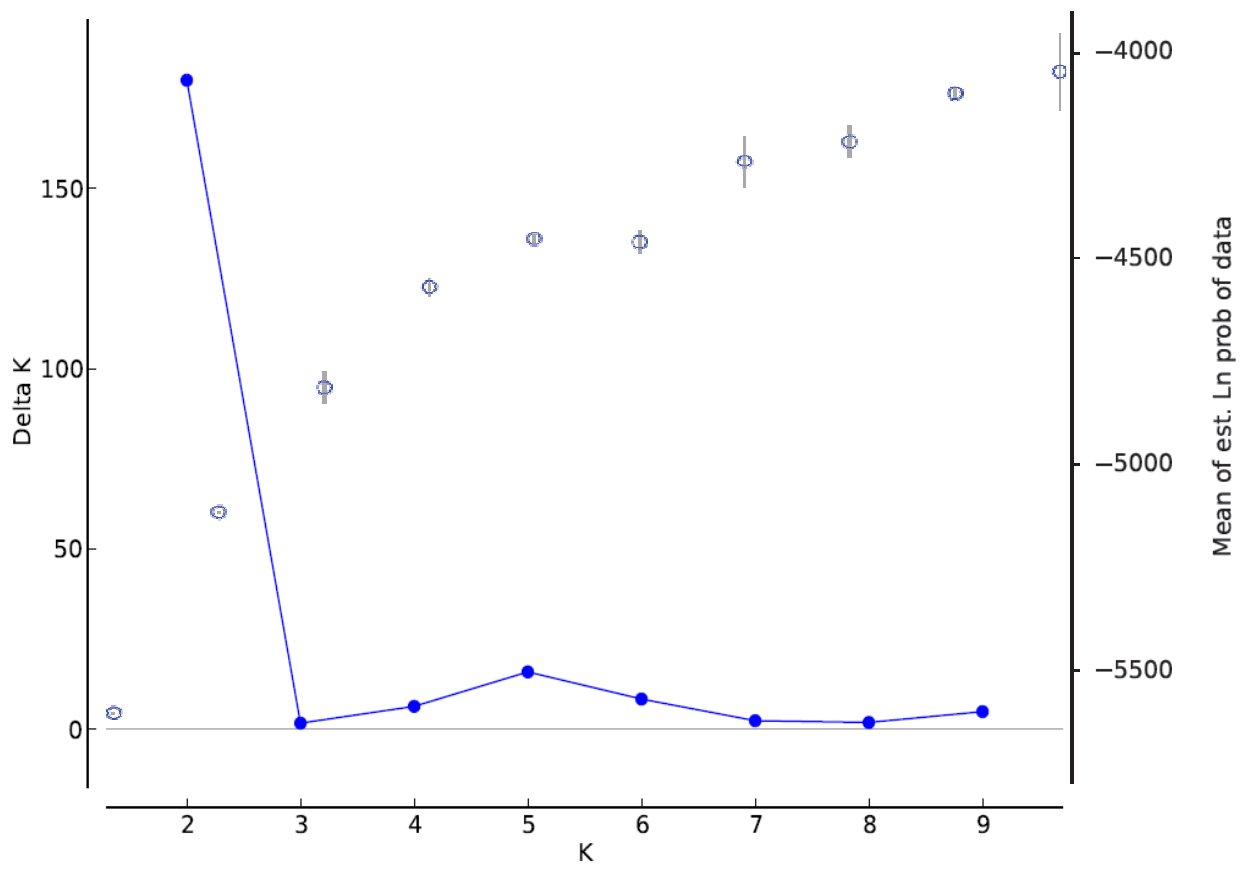


Figura 3 – Estatística ΔK (círculos fechados) e Log Likelihood (círculos abertos) para diferentes K (grupos genéticos) no STRUCTURE 2.3.3.

Figura 4

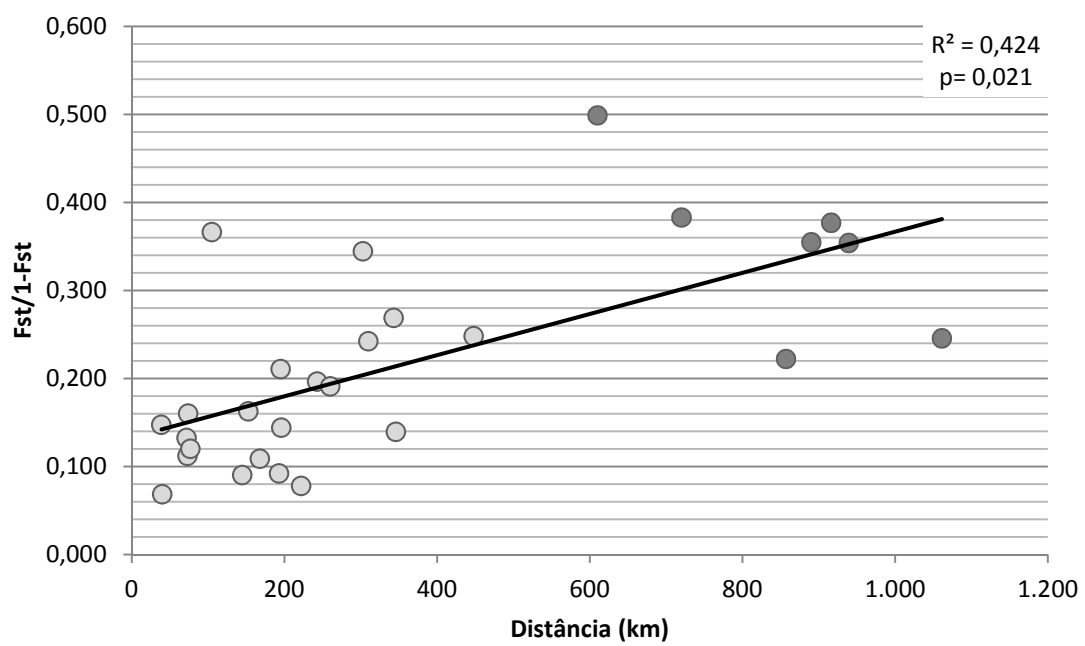


Figura 4 – Relação entre o F_{ST} (Slatkin) e distâncias geográficas (em km) entre as populações de *Aechmea coelestis* (correlação do teste de Mantel. $r = 0,424$ e $p < 0,01$). Os círculos mais escuros representam a população ESP.

APÊNDICE

Desenvolvimento de novos loci de SSR

O isolamento dos marcadores envolveu a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com repetições (CT)_n e (GT)_n biotinizadas e ligadas a esferas magnéticas como descrito por Kijas *et al.* (1994) com modificações de Billote *et al.* (1999). Os fragmentos de SSR selecionados foram ligados ao vetor pGEM-T “Easy” (Promega) seguindo protocolos descritos pelo fabricante e usados para transformar células competentes XL-1 “Blue” (*Escherichia coli*). As colônias transformadas foram cultivadas em meio contendo ampicilina e X-galactosidase. Em seguida, as 96 colônias recombinantes obtidas foram sequenciadas seguindo protocolo descrito por Palma-Silva *et al.* (2007). As seqüências foram alinhadas e editadas no programa SEQUENCHER v. 3.0, para posterior seleção das que possuíam repetições do tipo SSR. Sequências flanqueadoras das regiões de SSR foram desenhadas com auxílio do software PRIMER3 V0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000), tendo por objetivo produzir fragmentos com cerca de 100-200 pares de bases. Um total de sete loci de microsatélites foram desenhados e testados quanto a amplificação e polimorfismo em 26 indivíduos de quatro populações naturais de *Aechmea coelestis*.

Otimização de loci heterólogos de marcadores microsatélites

Até o momento, cerca de 60 loci de SSR nucleares foram desenvolvidos para espécies de Bromeliaceae (*Pitcairnia geykesii*: Sarthou *et al.* 2003; *Tillandsia fasciculata* e *Guzmania monostachya*: Boneh *et al.* 2003; *Vriesea gigantea* e *Alcantarea imperialis*, Palma-Silva *et al.* 2007; *Pitcairnia albiflos*: Paggi *et al.* 2008, *Aechmea winkleri*: Goetze, 2010, *Ananas comosus*: Wöhrmann e Weising, 2011)(Tabela 3). Destes, 36 loci de microsatélites foram selecionados, com base nos resultados de

amplificação heteróloga publicados, para serem testados nas espécies de interesse. Os testes de amplificação seguiram os protocolos e condições descritas por Palma-Silva *et al* (2007).

Conclusões e Perspectivas

- *Aechmea coelestis* apresenta grande diferenciação morfológica intra- e inter-populacional, com amplo polimorfismo de caracteres florais e vegetativos, o que fez os taxonomistas, por muito tempo, a considerarem três espécies distintas. A revisão taxonômica deste grupo não confirmou essa classificação, sendo aqui propostos dois novos sinônimos.
- A análise dos dados morfológicos foi corroborada por análise com marcadores moleculares multilocus (SSR) aplicados ao nível populacional.
- As análises de marcadores moleculares microssatélites revelaram alta diversidade genética em todas as populações analisadas e estrutura populacional moderada/alta em *Aechmea coelestis*. Os altos índices de coeficiente de endocruzamento indicam que a espécie possui altos índices de endogamia e/ou subdivisão entre as populações.
- Não existem evidências genéticas para a consideração de espécies distintas, já que os valores de fluxo gênico, em sua maioria são $> 1N_e m$ e a baixa diferenciação dos grupos também não indica a existência de mais de um táxon.
- Estudos futuros são necessários para melhor compreensão dos processos evolutivos envolvidos na diferenciação populacional de *Aechmea coelestis*. Neste sentido, populações do estado do Rio de Janeiro deverão ser amostradas e analisadas morfológica e geneticamente. Da mesma forma, estudos morfológicos da população do Espírito Santo auxiliarão no reconhecimento desta como espécie insipiente ou não.

Referências Bibliográficas

Almeida, CMA (2006) Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 60 pp.

Alves GM, Filho AR, Puchalski A, Reis MS, Nodari RO e Guerra MP (2004) Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic Forest. *Plant Genetic Resources* 2: 23-28.

Baker JG. (1879) A synopsis of the genus *Aechmea* R. & P. *Journal of Botany* 17: 129-135; 161-168;

Baker JG. (1889). *Handbook of the Bromeliaceae*. London: George Bell & Sons.

Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ e Lexer C (2007/a) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol Ecol* 16: 1981-1992.

Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF e Lexer C (2007/ b) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16: 3759-3767.

Barbará T, Lexer C, Martinelli G, Mayo S, Fay MF e Heuertz M (2008) Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). *Heredity* 101: 285-296.

Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S e Lexer C (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related

bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* e *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 103: 65-77.

Barbosa, A.R. (2011) Biosistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações". Universidade Estadual de Feira de Santana – Dissertação de mestrado.

Barfuss, M.H.J., Samuel, R., Till, W. & Stuessy, T.F. 2005. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany* 92: 337-351.

Benzing FH (2000) *Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation* Cambridge University Press, Cambridge.

Billote N, Risterucci A-M e Baurens F-C (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.

Bodo-Slotta T. A. e Porter D. M. (2006). Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2006, 151, 345–354.

Boneh L, Kuperus P e Van Tienderen PH (2003) Microsatellites in bromeliads *Tillandsia faciculata* and *Guzmania monostachya*. *Mol Ecol Notes* 3: 302-303.

Bromélias da Mata Atlântica – Nidularium. Rio de Janeiro: Hamburg Donnelley Gráfica Editora, 264 p.

Brown, G. K. & A. J. Gilmartin. 1984. Stigma structure and variation in Bromeliaceae - neglected taxonomic characters. *Brittonia* 36: 364-374.

Brown, G. K. & A. J. Gilmartin. 1988. Comparative ontogeny of bromeliaceous stigmas. In: P. Leins, S. Tucker and P. Endress (eds.) pp. 191-204. *Aspects of Floral Development*. Gebr. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany.

Brown, G. K. & A. J. Gilmartin. 1989. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *American Journal of Botany* 76: 657-665.

Brown, G.K. (2000) Dados Moleculares em Bromeliaceae. In: **Leme, E.M.C.** California, USA.

Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI e Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Epinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodivers Conserv* 15: 4357-4373.

Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI, Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation*, 15, 1572-9710.

Cavallero L, López D e Barberis IM (2008) Morphological variation of *Aechmea distichantha* (Bromeliaceae) in a Chaco forest: habitat and size-related effects. *Plant Biol* 11: 379-391.

Cavalli, S. S.; Winge, H. (2003) Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: UERGS, 2003. 165-176.

Chan R, Baldwin BG, Ornduff R. (2002) Cryptic goldfields: A molecular phylogenetic reinvestigation of *Lasthenia californica* sensu lato and close relatives (Compositae: Heliantheae sensu lato). *Am J Bot* 89: 1103–1112.

Corander J, Waldmann P, Sillanpaa MJ. (2003). Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genet* 163:367–374.

Cozzolino S, Noce ME, Musacchio A, Widmer A (2003) Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **90**:1681-1687.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press.

Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T. & Yeo, P.F. 1985. The families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Berlin, Springer-Verlag.

de Queiroz, K. (1998) The general lineage concept of species. Pages 57– 75 in *Endless forms: Species and speciation* (D. J. Howard, and S. H. Berlocher, eds.). Oxford University Press, New York.

Dieringer, D e Schlotterer C (2003) Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3: 167-169.

Domingues R, Machado MA, Forzza RC, Melo TD, Wohlres-Viana S e Viccini LF (2011) Genetic variability of an endangered Bromeliaceae species *Pitcairnia albiflos* from the Brazilian Atlantic rainforest. *Genetics and Molecular Research* 10 (4): 2482-2491

Doyle JJ e Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Duminil J, Di Michele M (2009) Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystem* 143, 528-542.

Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. (2011) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Excoffier, Laval LG, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.

Faria, A.P.G., Wendt, T. & Brown, G.K. (2004). Cladistics relationship of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Annals Missouri Botanic Garden* 91: 303-319.

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brazil.

Forzza, R.C. et al. 2010. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol. 1, p. 778-816.

François O, Ancelet S e Guillot G. (2006) Bayesian clustering using hidden Markov random fields in spatial population genetics. *Genet* 174: 805–816.

Freeland, Joanna R, and Anderson, Sarah (2007) Molecular Ecology. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE e Sysmsma JK (2004) Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south american-african disjunctions in Rapataceae and Bromeliaceae based on *ndhf* sequence data. *Int J Plant Sci* 165 (4 Suppl.): S35-S54.

Goetze, M. (2010) Filogeografia e diversidade genética de *Aechmea caudata* (Lindm.) e *A. winkleri* (Reitz) (Bromeliaceae): implicações taxonômicas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

González-Astorga J, Cruz-Angón A, Flores-Palacios A e Vovides AP (2004) Diversity and genetic structure of the mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. Ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 94: 545-551.

Hamrick J. L. e Godt M. J. W. (1996) Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 351 (1345) 1291-1298;

Horres, R., Schulte, K., Weising, K. & Zizka, G. 2007. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso* 23: 27-43.

Izquierdo LY e Piñero D (2000) High genetic in the only know population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Aust J Bot* 48: 645-650.

Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology and Evolution*, 11, 424-430.

Kamke, R.; Lopes, B. C.; Schmid, S.; Zillikens, A.; Steiner, J. (2010) Diversidade, frequência e comportamento dos visitantes nas flores da bromélia *Aechmea caudatana* Mata Atlântica de SC. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Zoologia.

Lammi A, Siikamaki P, Mustajarvi K (1999) Genetic Diversity, Population Size, and Fitness in Central and Peripheral Populations of a Rare Plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology* 13, 1069-1078.

Lenzi M, Matos, JZ e Orth AI (2005) Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var: *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Bot Bras* 20: 487-500.

Loveless M. D. e Hamrick J. L. (1984) Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol 15, p 65-95.

Luther HD (2008) An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. *The Bromeliad Society International*, 11 ed. Sarasota, The Marie Selby Botanical Gardens, Bromeliad Society International.

Machado, C G e Semir J (2006) Fenologia da floração e biologia floral de bromeliáceas ornitófilas de uma área da Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. *Revista Brasil. Bot.*, V.29, n.1, p.163-174.

Marshall, J. C., E. Arevalo, E. Benavides, J. L. Sites, and J.W. Sites. (2006) Delimiting species: Comparing methods for mendelian characters using lizards of the *Sceloporus grammicus* (Squamata: Phrynosomatidae) complex. *Evolution* 60:1050–1065.

Martinelli, G. (1997) Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. Pp. 213-250. In: H.C. Lima & R.R. Guedes-Bruni (eds.). *Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em mata atlântica*. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Martins, S.E, Wanderley, M.G.L. & Proença, S.L. 2007. 2. *Aechmea* Ruiz & Pav., *nom. cons.* In Wanderley, M.G.L. & Martins, S.E. (coord.) 2007. Bromeliaceae. In M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giullietti. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo, IBt, FAPESP, p.44-59.

Matallana G, Godinho MAS, Guilherme FAG, Belisario M, Coser TS e Wendt T. (2010) Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Systematics Evolution*. Volume 289, Numbers 1-2, 57-65

McDonald' DB, Potts WK (1997) DNA Microsatellites as Genetic Markers at Several Scales. Avian molecular evolution and systematics. DP Mindell ed. Academic Press, San Diego. pp 29-50.

Mez C. (1892). Bromeliaceae. In: Martius CP. Von, Eichler AW, Urban I, eds *Flora brasiliensis*. Vol. 3, part. 3. Munchen, Wien, Leipzig, 302-377.

Mez C. (1896). Bromeliaceae. In: Candolle ALPP, Candolle ACP, eds. *Monographthe Phanemgamanum*. Vol. 9. Paris: G. Masson.

Mez, C. (1935). Bromeliaceae. In: Engler HGA, ed. *Das PJEanzenreich*. Heft 100, Vol. iv(32). Berlin: Wilhelm Engelmann.

Morjan CL, Rieseberg LH (2004) How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Molecular Ecology*, 13, 1341–1356.

Murawski AD e Hamrick JL (1990) Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *Am J Bot* 77: 1201-1208.

Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T e Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic rain forest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Resou* 8: 980-982.

Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbara T, Lexer C, Gimenes A, Bered F e Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads species. *Mol Ecol Notes* 7: 265-267.

Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F e Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503-512.

Palma-Silva, C., Wendt, T., Pinheiro, F., Barbará, T., Fay, M. F., Cozzolino, S. e Lexer, C. (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology*, 20: 3185–3201.

Petit RJ e Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends Ecol Evol* 24: 386-393.

Powell W, Morgante M, McDevitt R, Vendramin GG and Rafalski JA (1995) Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7759–7763.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

Raymond M. & Rousset F, (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249

Review of Ecology and Systematics 4, 165-187.

Ribeiro, R.A., Ramos, A.C.S., Lemos Filho, J.P. e Lovato, M.B. 2005. Genetic variation in remnant populations of *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Annals of Botany*, 95, 1171-1177.

Rosenberg, N. A., T. Burke, K. Elo, M. W. Feldmann, P. J. Freidlin, M. A. M. Groenen, J. Hillel, A. Maki-Tanila, M. Tixier-Boichard, A. Vignal, K. Wimmers, e

S. Weigend. (2001) Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics* 159:699–713.

Rousset, F., (2008). Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.

Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J e Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcainia geyskii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Mol Ecol Notes* 3: 221-223.

Sass, C. & Specht, C.D. 2010. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55(2): 559-571.

Scarano, FR; Duarte, HM; Rôças, G; Barreto, SMB; Amado, EF; Reinert, F; Wendt, T; Mantovani, A; Lima HRP e Barros, CF (2002) Acclimation or stress symptom? An integrated study of intraspecific variation in the clonal plant *Aechmea bromeliifolia*, a widespread CAM tank-bromeliad. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140: 391–401.

Schmid, S.; Schmid, V.S.; Zillikens, A.; Harter-Marques, B. & Steiner J. (2010) Bimodal pollination system of the bromeliad *Aechmea nudicaulis* involving hummingbirds and bees. *Plant Biology*. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00348.x

Schlötterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20, 211–215

Schulte, K., Barfuss, M.H.J. & Zizka, G. (2009). Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51(2): 327-339.

Scrok, GJ; Varassin, IG (2011). Reproductive biology and pollination of *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae). *Acta Bot. Bras.*, Feira de Santana, v. 25, n. 3.

Sgorbati S, Labra M, Gruni E, Barcaccia G, Galasso G, Boni U, Mucciarelli M, Citterio S, Iramátegui AB, Gonzáles LV e Scannerini S (2004) A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biol* 6: 1-9.

Shaffer, HB e Thomson, RC (2007) Delimiting Species in Recent Radiations. *Syst. Biol.* 56(6):896–906

Shaw AJ. (2000) Molecular phylogeography and cryptic speciation in the mosses, *Mielichhoferia elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae). *Mol Ecol* 9: 595–608.

Siqueira Filho, J.A. & Machado, I.C.S. (2001) Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 15(3): 427-443

Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787±792.

Smith LB, Kress WJ. (1989) New or restored genera of Bromeliaceae. *Phytologia* 66(1): 70-79.

Smith LB, Kress WJ. (1990) New genera of Bromeliaceae. *Phytologia* 69(4): 271-274.

Smith, L.B. & Downs, R.J. (1979). Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* Monograph 14 (3). New York, Hafner Press. 1493-2141p.

Smith, L.B. & Downs, R.J. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* Monograph 14(1) New York, Hafner Press. 1-658p.

Smith, L.B. & Downs, R.J. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* Monograph 14 (2) New York, Hafner Press. 663-1492p.

Smith, L.B. & Till, W. 1998. Bromeliaceae. In K. Kubitzki, P.J. Rudall, P.S. Stevens & T. Stützel (eds.) *The families and genera of vascular plants*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, p. 74-99.

Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry*, 3rd e. WH, Freeman, San Francisco, California USA.

Soltis DE, Gilmartin J, Rieseberg L e Gardner S (1987) Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 74: 531-537.

Soranzo, N. Provan J and Powell W (1999) An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42:158–161.

Soule M (1973) The Epistasis Cycle: A Theory of Marginal Populations. *Annual*

Squirrell J, Hollingsworth PM, Bateman RM, Tebbitt MC, Hollingsworth ML (2002). Taxonomic complexity and breeding system transitions: conservation genetics of the *Epipactis leptochila* complex (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, **11**, 1957-1964.

Till, W. 2000. Tillandsioideae. In D.H. Benzing (ed.). *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p. 555-571.

Van Der Niet T, Johnson SD, Linder HP (2006) Macroevolutionary data suggest a role for reinforcement in pollination system shifts. *Evolution*, **60**, 1596–16016

Wanderley, M.G.L. & Martins, S.E. (coord.) 2007. Bromeliaceae. In M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giulietti. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo, IBt, FAPESP, p. 39-161.

Weir BS e Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Wendt, T., 1997. A review of the subgenus *Pothuava* (Baker) Baker of *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) in Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 125(3): 245-271.

Wendt T, Canela MBF, Morrey-Jones JE, Henriques AB, Rios RI (2000) Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. *Syst Bot* 25: 389-398.

Wendt, T.; Canela, M.B.F.; Faria, A.P.G. & Rios, R.I. (2001) Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 88(10):1760-1767.

Wendt T, Coser TS, Matallana G e Guilherme FAG (2008) An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 275: 31-41.

Whittall JB, Hellquist CB, Schneider EL, Hodges SA. (2004) Cryptic species in an endangered pondweed community (*Potamogeton*, Potamogetonaceae) revealed by AFLP markers. *Am J Bot* 91: 2022–2029.

Wöhrmann T e Weising K. (2011) In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Tag Theoretical and Applied Genetics*. Volume 123, Number 4.

Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 1931 May; 16(3): 290.

Wright, S. (1949) The Genetical Structure of Populations. *Annals of Human Genetics*, 15: 323–354.

Zanella, CM (2009) Caracterização genética, morfológica e fitoquímica de populações de *Bromelia antiacantha* (Bertol.) do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 96 pp.