

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

GISLAINE MOREIRA DE MIRANDA

Genética da conservação e fluxo gênico de *Dyckia ferruginea* Mez (Bromeliaceae)

Campo Grande – MS

2017

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

GISLAINE MOREIRA DE MIRANDA

Genética da conservação e fluxo gênico de *Dyckia ferruginea* Mez (Bromeliaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do grau de mestre.

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Camila Martini Zanella – Universidade de Cambridge, UK

Campo Grande – MS

2017

Dedico esta dissertação aos meus pais, Arlindo e Maria Lúcia, que sempre me apoiaram e realizaram junto comigo mais esse sonho e também aos meus dois filhos, Isabely e Felipy, em especial a “Bely” que desde o início da minha graduação foi a minha motivação para sempre seguir em frente e vencer os desafios sobrepostos a mim. Ela que de alguma forma pagou o preço junto comigo para que eu pudesse conquistar mais uma vitória. Ao “Lipy”, que com a sua chegada de forma prematura ao final do meu mestrado colocou em prova a minha fé e o meu amor. Ele tão pequeno me trouxe ensinamentos valiosos e me mostrou o quanto é forte e o quanto lutou pela vida.

Agradecimentos

Ao Pai (Deus) ao Filho (Jesus) e ao Espírito Santo, pela minha vida, por me proteger, me fortalecer e por permitir que as suas promessas tenham se concretizado em minha vida.

A minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Gecele Matos Paggi, por ter aceitado me orientar desde o início da graduação, pelo apoio, compreensão e pelos puxões de orelha durante a graduação e o mestrado. Sempre me lembrarei das suas frases de incentivo: “Vai dar tudo certo”, “Vai dar tempo” e “Planejamento e Organização”.

A minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Camila Martini Zanella, por me auxiliar e por ter cedido amostras biológicas das suas coletas e amostras de DNA para a realização deste trabalho.

A minha colega de graduação, parceira de laboratório, que além de amiga é minha confidente, Brenda Baía Brandão. Obrigada pela amizade e pela parceria que existe entre nós desde a graduação.

A Fernanda de Russo Godoy e a Luciana Vicente da Silva pela disponibilidade e ajuda para executar os desafiantes programas de diversidade genética e também com as análises dos dados.

Ao Gabriel Faggioni pela disponibilidade e ajuda na interpretação dos dados genéticos e pela aula que me deu de diversos programas importantes para o meu trabalho.

A Camila de Aguiar Melo e ao Walter Kranz, pelas coletas e disponibilidade das informações sobre a espécie *Dyckia ferruginea*.

A todos os colegas do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Mato

Grosso do Sul, Instituto Biociências, Campus do Pantanal.

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

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

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências/Campus do Pantanal por todo suporte no laboratório de Genética e Microrganismos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, por contribuir com minha formação educacional, pessoal e profissional e aos professores do Programa pelos ensinamentos, palavras de apoio e encorajamento.

A todos os colegas de turma, pela convivência, em especial a Débi, Lu, Paula, pela amizade e descontração, a Jô e a Larissa pela amizade, descontração e pelas hospedagens em Campo Grande durante o mestrado.

A secretaria Anahí pela compreensão e por repassar todas as informações necessárias correspondente aos prazos e aos técnicos do programa que apoiam os alunos nas coletas em especial o “Joãozinho” que nos auxiliou muito na Botânica de Campo.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À FUNDECT pela bolsa concedida.

Agradeço em especial a minha família, pais Maria Lúcia e Arlindo por todo apoio aos meus estudos e em tudo que me disponho a fazer, irmãs Gisele e Julyanne pelo incentivo, ao companheiro Lindomar, pelo amor, paciência e confiança.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Resumo

Dyckia ferruginea é uma bromélia de distribuição restrita aos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e, até o momento, não há registros que ela esteja inserida em alguma Unidade de Conservação. Desse modo, caracterizar os níveis de diversidade genética dentro de suas populações é de importância primária para futuros estudos evolutivos, de conservação, melhoramento e manejo dessas plantas. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a diversidade genética e fluxo gênico em populações naturais de *Dyckia ferruginea* (Bromeliaceae) no estado do Mato Grosso do Sul. Para isso, foram amostrados 107 indivíduos de cinco populações. Foram testados 19 marcadores de microssatélites nucleares descritos para outras espécies de Bromeliaceae e 12 marcadores de microssatélites plastidiais desenvolvidos para o gênero *Dyckia*. No final, foram utilizados seis marcadores polimórficos nucleares e seis marcadores plastidiais. Os índices de diversidade genética foram observados nas cinco populações de *D. ferruginea*, variando de $H_O = 0,442$ a $H_O = 0,665$ para os marcadores nucleares e $H_E = 0,917$ a $H_E = 1$; e 39 haplótipos para os marcadores plastidiais. Baixos a moderados níveis de diferenciação genética entre populações foram encontrados com comparações de F_{ST} par a par variando de 0,046 a 0,110 com um número de migrantes por geração variando entre 0,299 e 1,308, com proporção da variação genética devido a diferenças dentro das populações tanto para os marcadores nucleares (88,39%), quanto para os plastidiais (91,87%) demonstrando haver um baixo fluxo gênico entre as cinco populações. A análise bayesiana revelou a presença de apenas dois grupos genéticos ($K = 2$). As populações apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy Weinberg, com o coeficiente de endocruzamento ($F_{IS} = 0,760$). A taxa de fluxo de pólen em relação ao fluxo de semente mostrou um fluxo gênico mais eficiente via sementes. *Dyckia ferruginea* apresentou baixos índices de diversidade genética e baixo fluxo gênico. Não há registros que *D. ferruginea* esteja

inclusa em Unidades de Conservação e que se encontra na lista de espécies ameaçadas, portanto, são necessárias estratégias de conservação da espécie para que possa garantir ao máximo a permanência dessas populações naturais em longo prazo, bem como a biodiversidade do ecossistema a qual ela pertence.

Palavras-chave: Diversidade, genética de populações, microssatélites, Cerrado.

Abstract

Dyckia ferruginea is a bromeliad restricts to the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul. To date, there are no records that the species is included in any conservation unit. Characterizing the levels of genetic diversity within populations is of primary importance for any evolutionary, conservation, or breeding study and management of plants. The general objective of this study was to study the genetic diversity and gene flow in natural populations of *Dyckia ferruginea* (Bromeliaceae) in areas that are influenced by the Cerrado in the state of Mato Grosso do Sul State. For this, 107 individuals from five populations were sampled. Nineteen microsatellite markers described for other species of Bromeliaceae and twelve plastid microsatellite markers developed for the genus *Dyckia* were tested in *D. ferruginea*. Six polymorphic nuclear markers and six plastidial markers were used to infer the diversity and genetic structure of *D. ferruginea* populations. High genetic diversity indexes were observed in the five populations of *D. ferruginea*, ranging from ($H_O = 0,442$ to $H_O = 0,665$) for the nuclear markers and ($H_E = 0.917$ to $H_E = 1,000$ and 39 haplotypes) for the plastid markers. Low to moderate levels of genetic differentiation among populations were found with pairwise F_{ST} comparisons ranging from 0.046 to 0.110 with a number of migrants per generation ranging from 0.299 to 1.308, and a proportion of genetic variation due to differences within populations for nuclear (88.39%), and for plastids (91.87%) markers, showing a low gene flow among the five populations. Bayesian analysis revealed the presence of only two genetic groups ($K = 2$). Populations showed significant deviations from the Hardy-Weinberg Equilibrium, with the inbreeding coefficient of 0.760. The flow rate of pollen in relation to seed flow showed a more efficient gene flow via seeds. *Dyckia ferruginea* showed low rates of genetic diversity and low gene flow. There are no records that *D. ferruginea* is included in Conservation Units and is on the list of

endangered species, therefore, conservation strategies of the species are necessary in order to guarantee the long-term permanence of these natural populations to the maximum, as well as Biodiversity of the ecosystem to which it belongs.

Keywords: Diversity, population genetics, microsatellites, Cerrado.

Sumário

1	Introdução Geral	11
1.1	Bromeliaceae.....	11
1.2	O gênero <i>Dyckia</i> Schult. & Schult.f.....	12
1.3	Fluxo Gênico e Conservação Biológica.....	14
1.4	Marcadores Moleculares do tipo microssatélite.....	16
1.5	Cerrado.....	17
2	Objetivo.....	19
2.1	Objetivos Específicos.....	19
3	Referências Bibliográficas	20
4	Artigo	27
5	Introdução	31
6	Material e Métodos	33
6.1	Espécie e área de estudo.....	33
6.2	Coleta do material vegetal e extração de DNA.....	34
6.3	Marcadores moleculares nucleares e plastidiais, PCR e genotipagem	35
6.4	Análises de diversidade genética	36
6.5	Fluxo gênico via dispersão de pólen e semente	38

7	Resultados	38
7.1	Diversidade e estrutura genética nuclear	38
7.2	Diversidade e estrutura genética Plastidial e fluxo gênico via dispersão de.....	41
	pólen e semente	41
8	Discussão	41
8.1	Diversidade e estrutura genética nuclear.....	41
8.2	Diversidade genética plastidial e fluxo gênico via dispersão de pólen e	44
	sementes.....	44
8.3	Conservação	45
9	Conclusões	47
10	Referências bibliográficas	48
11	Legenda das Figuras	55
12	Considerações Finais	67
13	Anexos	68

1 Introdução Geral

1.1 Bromeliaceae

As bromélias são plantas típicas do Novo Mundo, com distribuição geográfica desde os Estados Unidos, nos estados da Virgínia, Texas e Califórnia (limite norte), até o norte da Patagônia, na Argentina (limite sul). A única exceção é *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms e Mildbr., localizada no oeste da África, na região da Guiné (Porembski e Barthlott, 1999), o que parece ter sido um evento de recente dispersão a longa distância (Givnish et al., 2011). Informações oriundas de macro e microfósseis (pólen) indicam a existência de representantes de Bromeliaceae a partir do médio Terciário (Benzing, 2000). Segundo Givnish et al. (2011) as Bromélias surgiram no Escudo das Guianas há cerca de 100 Milhões de anos durante o Período Cretáceo e as subfamílias existentes atualmente começaram a divergir apenas acerca de 19 Ma. Estes autores também sugeriram que há 15,4 Ma as Bromélias chegaram às regiões da América Tropical e subtropical.

Bromeliaceae é uma das famílias de maior riqueza e diversidade do Neotrópico (Martinelli et al., 2008), apresentando mais de 3140 espécies que passaram por uma extensa radiação adaptativa (Luther, 2008). Com base em estudos morfológicos, a família Bromeliaceae era dividida em três subfamílias: Bromelioideae com aproximadamente 650 espécies, Pitcairnioideae composta por cerca de 890 espécies e Tillandsioideae com cerca de 1000 espécies (Smith e Downs, 1979). Porém, um estudo baseado em oito regiões plastidiais, demonstrou que Pitcairnioideae é uma subfamília parafilética e propõe uma subdivisão da mesma e uma nova classificação baseada em oito subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae (Givnish et al., 2011).

Em diversos ambientes as bromélias atuam como um subsistema ecológico contribuindo na estabilidade dos ecossistemas (Benzing, 2000). Esses vegetais são 15 conhecidos como fitotelmata, pois abrigam em suas cisternas desde algas unicelulares, algas filamentosas, protistas, invertebrados e vertebrados, constituindo um micro-habitat importante para esses organismos (Matos, 2000). Outros animais, por exemplo, aves, crustáceos, formigas e abelhas, utilizam essas plantas como local para nidificação, abrigo ou alimentação (Sazima et al., 1996; Sazima et al., 2000; Lenzi et al., 2006). Atualmente, mais de 90 espécies de bromélias são utilizadas no mundo como fonte de fibras, forragem, medicinais, rituais místicos, alimentação humana, entre outros (Bennet et al., 2001). Entretanto, há uma carência de bromélias cultivadas, favorecendo o extrativismo ilegal e dessa maneira causando uma redução no número de indivíduos, levando a perda da diversidade genética nas suas populações (Coffani Nunes, 2002).

1.2 O gênero *Dyckia* Schult. & Schult.f.

É composto por cerca de 150 espécies (Smith e Downs, 1974; Luther, 2008), tendo o Cerrado como seu centro de diversidade, principalmente na região do estado de Minas Gerais (Versieux e Wendt, 2007). A maior parte das espécies apresenta distribuição restrita (Smith e Downs, 1974; Versieux et al., 2015). Encontrado na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil são encontradas 93% das espécies (140 espécies), com distribuição que vai do nível do mar até 1000 m de altitude, em ambientes expostos ao sol nos domínios Mata Atlântica, Caatinga, Campos Rupestres, Restinga e Cerrado (Smith e Downs, 1974; Krömer e Kessler, 1999; Forzza et al., 2017).

Espécies de *Dyckia* são usualmente terrestres, xerofíticas, crescendo em solos bem drenados, ou podem ser rupícolas, sendo encontradas em diversos afloramentos rochosos,

em ambientes secos e algumas vezes úmidos (Leme et al., 2012). São plantas caracterizadas por formar rosetas com folhas coriáceas ou suculentas, com espinhos marginais bem desenvolvidos, sem a formação do tanque que acumula água (caráter típico de Bromeliaceae - Crayn et al., 2004) (figura 1A). Apresentam inflorescência racemosa com escapo lateral, simples ou ramificado, flores predominantemente amarelas, cores alaranjadas, ou vermelhas, mas as cores vinhoacastanhadas ou esverdeadas são relatadas em poucas espécies (figura 1B). As flores são ligeiramente perfumadas, quase sésseis para pedicelo, tubulares (por vezes convergentes no ápice), ou corolas campanuladas (Leme et al., 2012). As plantas propagam-se vegetativamente por meio de rizomas subterrâneos curtos ou longos (Smith e Downs, 1974; Leme et al., 2012).

O gênero *Dyckia* Schult é monofilético e junto com *Encholirium* forma um grupo irmão com *Deuterocohnia* Mez., e aparentemente, se espalhou para o escudo brasileiro a partir do Andes em torno de 8,5 Ma (Givnish et al, 2011; Krapp et al., 2014). No entanto, estudos específicos sobre a filogenia de *Dyckia* e gêneros relacionados com base em cinco loci de DNA do cloroplasto, fornecem evidências de que a maioria das espécies de *Dyckia* teve uma radiação muito mais recente (a partir de 2,9 Ma). A hipótese de uma radiação explosiva recente para *Dyckia* pode explicar a dificuldade de discernir características morfológicas consistentes e taxonomicamente úteis para distinguir espécies deste gênero, mesmo com espécimes completos e plenamente documentados em mãos (Leme et al., 2012).



Figura 1. Detalhe da base foliar em formato de roseta com folhas suculentas e espinhos marginais bem desenvolvidos (A). Detalhe do escapo floral saindo do meristema lateral da base foliar da planta e coloração da flor (B).

1.3 Fluxo Gênico e Conservação Biológica

Nas plantas que se reproduzem sexuadamente, o pólen e a semente são os principais componentes do fluxo gênico, sendo que a capacidade de dispersão deles está relacionada com a habilidade das espécies em manter a diversidade genética e colonizar novos locais (Nathan et al., 2008; Chybicki e Burczyk, 2010). A dispersão do pólen e das sementes pode ocorrer a curtas distâncias, influenciando principalmente os padrões de recrutamento e a utilização de recursos locais e também a longas distâncias, afetando a disseminação e as taxas de colonização (Nathan et al., 2008).

Caracterizar os níveis de diversidade genética dentro das populações é de importância primária para qualquer estudo evolutivo, de conservação, melhoramento e manejo de plantas (Sales et al., 2001). Fatores como: sistema reprodutivo, mecanismos de dispersão de sementes, a redução no tamanho da população pode influenciar a estrutura genética da população (Cavallari et al., 2006). Podem interferir em vários fenômenos genéticos como endogamia, gargalos populacionais, efeito fundador, fluxo gênico,

seleção natural, deriva genética e mutação (Hartl et al., 1997). Populações pequenas e isoladas são mais sujeitas aos efeitos da endogamia e da deriva genética, revelando menor variabilidade genética populacional (Bouzart, 2001).

A conservação dos recursos genéticos pode ocorrer através da preservação de amostras fora do seu habitat natural, conhecido como conservação *ex situ*, e/ou através da proteção das populações em seus locais de ocorrência, chamado de conservação *in situ* (Frankham et al., 2009). As espécies também podem ser preservadas em condições ambientais semelhantes ao seu habitat, quando seu ambiente natural estiver ameaçado ou for destruído, denominada de conservação *inter situ* (Guerrant et al., 2004). As diferentes formas de conservação devem manter populações geneticamente distintas na tentativa de evitar a perda da diversidade genética de uma espécie (Thornton et al., 2008).

Cavallari et al., (2006) ao analisar a diversidade genética em três espécies do gênero *Encholirium* (Bromeliaceae), definiu que *Encholirium biflorum* e *Encholirium pedicellatum*, são espécies criticamente ameaçadas de extinção, a retirada de um único indivíduo do habitat implica em perda significativa da diversidade genética na natureza, e, portanto, deve ser evitada.

Até o momento, não há registros que a espécie *D. ferruginea* esteja inserida em alguma Unidade de Conservação (Forzza et al., 2017; IUCN). No entanto, ela se concentra em áreas de Cerrado. A expansão das atividades agropecuárias transformou o Cerrado em um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo, pois boa parte da sua vegetação já foi devastada (Myers, 1988; Myers et al., 2000). Portanto, estudos genéticos se fazem necessários afim de se preservar o potencial evolutivo de *Dyckia ferruginea* e também para contribuir com informações relevantes que podem ser úteis para estratégias conservacionistas da espécie e da biodiversidade do ecossistema ao qual ela pertence.

1.4 Marcadores Moleculares do tipo microsatélite

Microsatélites (SSRs, do inglês Simple Sequence Repeat, ou STRs, do inglês Single Tandem Repeat) são muito variáveis e abundantemente distribuídos no genoma de eucariotos. São unidades curtas (de dois a seis pares de bases), repetidas uma após a outra. O alto polimorfismo característico desse tipo de marcador leva a possibilidade de identificar perfis característicos de cada indivíduo de uma mesma espécie, de acordo com a variação no número das repetições. Os polimorfismos individuais são identificados a partir da amplificação por PCR da região contendo a repetição, usando iniciadores ancorados em regiões que flanqueiam o microsatélite. As regiões flanqueadoras são conservadas dentro e entre espécies e muitas vezes entre gêneros ou até em níveis taxonômicos mais elevados (Turchetto-Zolet et al., 2013).

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

Análises utilizando marcadores moleculares de microsatélites fornecem informações sobre alguns fatores que determinam a estrutura genética populacional, tais como estimativas de padrões de dispersão do pólen, distância de dispersão e fluxo gênico,

que são particularmente importantes para a otimização de programas de conservação in situ (Dawson et al., 1997; He e Smouse, 2002, He et al., 2004; Turchetto-Zolet et al., 2013).

1.5 Cerrado

O Estado de Mato Grosso do Sul, situado na região Centro-Oeste do Brasil, possui uma superfície de 358.159 km² e limita-se a oeste com a Bolívia e Paraguai, a Norte com o Mato Grosso, a Sul com o Paraguai e o Paraná, e a leste com São Paulo, Minas Gerais e Goiás. A vegetação do Mato Grosso do Sul é composta pelas províncias fitogeográficas do Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica, sendo que 60,14% da área do estado é ocupada pelo Cerrado (Silva et al., 2011). No Estado o uso predominante da terra é a pecuária bovina extensiva de corte. A revolução da agricultura anual (soja, milho, algodão e cana de açúcar por exemplo) dependente de insumos e grande consumo de recursos não renováveis para aumentar a produtividade é a principal responsável pela perda de biodiversidade no MS (Paschoal, 1995).

O Cerrado é o segundo maior domínio fitogeográfico do Brasil, ocupando mais de 2 milhões de Km², e um dos 34 “hotspots” de biodiversidade do mundo (Mittermeier et al., 2005). O cerrado *lato sensu* é formado por três biomas: o campo tropical, a savana e a floresta estacional (Woodward, 2008). Campos tropicais são formações tropicais em que o estrato herbáceo é contínuo, com pequenos arbustos em baixas densidades (Woodward, 2008). Já as savanas são formações tropicais em que o estrato herbáceo é quase contínuo, interrompido apenas por arbustos e árvores em densidades variáveis, e em que os principais padrões de crescimento estão associados às estações úmidas e secas alternantes (Bourlière e Hadley 1983). Em savana, portanto, inclui-se o campo sujo, o campo cerrado

e o cerrado *stricto sensu* que é composto por um estrato arbóreo-arbustivo e outro herbáceo-graminoso (Eiten, 1994; Silva, 2002). Normalmente, ocorre sobre latossolos e neossolos quartzarênicos profundos, bem drenados, distróficos, ácidos e raramente sobre solos mesotróficos (Haridasan, 1992). Estes habitats são limitados a pequenas manchas nos planaltos ou topos de montanhas, e contêm muitas espécies de plantas adaptadas à seca e queimadas sazonais, com uma flora altamente endêmica (Giulietti et al., 1997).

A Caatinga, o Cerrado e o Chaco formam uma “diagonal seca”, a qual abrange uma larga faixa de vegetação seca que atravessa o Brasil em uma direção norte-leste para o sul-oeste (Prado e Gibbs, 1993), separando a Floresta Amazônica da Mata Atlântica, formando uma barreira ao fluxo gênico para um grande número de espécies (Cardoso et al., 2000, Lira et al., 2003, Ledru et al., 2007, Turchetto-Zolet et al., 2012).

Nas últimas décadas, o Cerrado tem sofrido um aumento demográfico expressivo e a vegetação nativa vem sendo substituída por monoculturas como a soja e a cana-de-açúcar, milho, arroz, algodão assim como pastagens. A ocupação humana e a rápida expansão das atividades agropecuárias transformaram o Cerrado em um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (Myers et al., 1988, Myers et al., 2000). Um total de mais de 80% da área do Cerrado já sofreu modificações providas pela ação antrópica (Alho et al., 1995, Myers et al., 2000), enquanto apenas 1,6% está em área de preservação permanente (Oliveira et al., 2002).

2 Objetivo

Realizar estudo sobre diversidade genética e fluxo gênico em populações naturais de *Dyckia ferruginea* (Bromeliaceae) em áreas de Cerrado no estado do Mato Grosso do Sul.

2.1 Objetivos Específicos

- Descrever a diversidade genética dentro e entre populações;
- Determinar a contribuição relativa de pólen em relação às sementes para o fluxo gênico da espécie.
- Identificar se há evidências genéticas de recente redução no tamanho populacional em *Dyckia ferruginea*.
- Contribuir com informações relevantes para auxiliar estudos relacionados a conservação de bromélias.

3 Referências Bibliográficas

- Alho CJ R, Martins ES (1995) Cerrado – impactos do processo de ocupação. In: Alho CJR, Martins ES (1995) De grão em grão o Cerrado perde espaço. Brasília, DF: World Wildlife Fund (WWF) e Sociedade de Pesquisas Ecológicas do Cerrado. v. 63. 66 p
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2009) Genetic relationship and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Ann Bot-London* 103:65-77
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16: 3759-3767
- Bennett BC, Baker MA, Gomez P (2001) Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador. *Adv Econom Bot*, 14:1-299
- Benzing DH (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 689 p
- Bouzar JL (2001) The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. *Biological Conservation*, 99: 277-284
- Bourlière, F. e Hadley, M (1983) Present-day savannas: an overview. In *Ecosystems of the world – tropical savannas* (D.W. Goodall, ed.). Elsevier, Amsterdam, p.1-17
- Cardoso SRS, Eloy NG, Provan J, Cardoso MA, Ferreira PCG (2000) Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9:1753-1760
- 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: 4357-4373
- Chybicki IJ, Burczyk J (2010) Realized gene flow within mixed stands of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) L. revealed at the stage of naturally established seedling. *Molecular Ecology*, 19: 2137-2151
- Coffani-Nunes JV (2002) Bromélias. In: Simões LL e Lino CF (org.) *Sustentável Mata Atlântica – A exploração de recursos vegetais*. Editora Senac, São Paulo, pp.119
- Crayn DM, Winter K e Smith JAC (2004) Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *PNAS*, 101: 3703-3708
- Dawson IK, Waugh R, Simons J, Powell W (1997) Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*. *Molecular Ecology*, 6: 179-183
- Eiten G (1994) Vegetação do Cerrado. Pp. 17-73. In: M. N. Pinto (Org.). *Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas*. Editora Universidade de Brasília
- Forzza, RC, Costa A, Siqueira Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L (2017) Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB27642>>. Acesso em: 30 de junho de 2017
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2009) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York
- Giulietti AM, Pirani JR and Harley RM (1997) Espinhaço range region, eastern Brazil. Pp. 397-404. In: Davis SD, Heywood VH, Herrera-MacBryde O, Villa-Lobos J and

- Hamilton AC (eds.). Centres of plant diversity. A guide and strategy for their conservation. v.3. The Americas. Cambridge, IUCN Publication Unity
- Givnish, TJ, Barfuss MHJ, E e BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872-895
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48:194-198
- Guerrant, F. JR. E. O., K. Havens, M. Maundner. (2004) Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild. Island Press, Washington DC, USA
- Haridasan M (1992) Observations on soils, foliar nutrient concentration and floristic composition of cerrado sensu stricto and cerrado communities in central Brazil. pp.171-184. In: Furley PA, Proctor J and Ratter JA (eds.). *Nature and Dynamics of Forest-Savanna Boundaries*. London, Chapman e Hall Publishing
- Hartl D; Clark AG (1997) *Principles of population genetics*. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates
- He T, Smouse PE (2002) Paternity analysis in *Ophiopogon xyloorrhizus* Wang et Tai (Liliaceae s.l.): selfing assures reproductive success. *Journal of Evolutionary Biology*, 3: 487-494
- He T, Krauss SL, Lamont BB, Miller BP, Enright NJ (2004) Long-distance dispersal in a metapopulation of *Bankasia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology*, 13: 1099-1109

- IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Huette L B, e Weising K (2014) Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematic and Evolution* DOI 10.1007/s00606-014-0985-0
- Krömer, T e Kessler, M (1999) Checklist of Bolivian Bromeliaceae with Notes on Species Distribution and Levels of Endemism. *Selbyana* 20 (2): 201-223
- Ledru MP, Salatino MLF, Ceccantini G, Salatino A, Pinheiro F, Pintaud JC (2007) Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Diversity and Distributions* 13:761-771
- Leme EMC, Ribeiro OBC e Miranda ZJG (2012) New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. *Phytotaxa* 67:9-37
- Lenzi M, Matos JZ, Orth AI (2006) Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta bot. Bras.* 20:487-500
- Lira CF, Cardoso SRS, Ferreira PCG, Cardoso MA, Provan J (2003) Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology* 12:3219-3225
- Luther HE (2008) An alphabetical list of bromeliad binomials, 11 th ed. Bromeliad Society International, Sarasota, Florida. 114 pp
- Matos JZ (2000) Ecologia de bromélias com ênfase em *Vriesea incurvata* Gaud. (Bromeliaceae), em áreas com vegetação primária e secundária da floresta tropical atlântica, no sul do Brasil. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF e Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59: 209-258

- Myers N, Mittermeier, RA, Mittermeier, CG, Fonseca, GAB, Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858
- Myers N (1998) Threatened biotas: "hotspots" in tropical forests. *The environmentalist*, oxford, UK. 8 (3): 187-208
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreux J, e Fonseca GAB (2005) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. México, Cemex, 392p
- Nathan R, Schurr FM, Spiegel O, Steinitz O, Trakhtenbrot A, Tsoar A (2008) Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends in Ecology e Evolution*, 23: 638-647
- Neri J, Nazareno GA, Wendt T, Palma-Silva C (2015) Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 58: 34-37
- Oliveira PS, Marquis RJ (2002) The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna. In: Cavalcanti R B, Joly CA Biodiversity and conservation priorities in the Cerrado region. New York: Columbia University Press. p. 351-367
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. *Molecular Ecology Resources*, 8(5): 980-982
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, BodaneseZanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes* 7: 654-657
- Paschoal AD (1995) Modelos sustentáveis de agricultura. *Agricultura Sustentável*, Jaguariúna, v.2, n. 1, p. 11-16

- Porembski S e Barthlott W (1999) *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. Harvard Papers in Botany 4: 175-184
- Prado DE e Gibbs PE (1993) Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. Annals of Missouri Botany Garden 80:902-927
- Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li SH, Margolis RL, Ross CA, Ferguson-Smith MA (1995) Microsatellite evolution – evidence for directionality and variation in rate between species. Nature Genetics 10: 337-343
- Sales E, Nebauer SG, Mus, M, Segura, J. (2001) Population genetic study in the balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. American Journal of Botany 88: 1750-1759
- Sazima I, Buzato S, Sazima M (1996) An assemblage of hummingbird – pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. Plant Biology, 109:p.149-160
- Sazima M, Buzato S, Sazima I (2000) Polinização por beija-flores em *Nidularium* e gêneros relacionados. In: Leme EMC. *Nidularium: Bromélias da Mata Atlântica*. Sextante Artes, Rio de Janeiro, pp.190-195
- Silva, Vila JS, Speranza EA, Vendrusculo LG, Esquerdo JCDM, Mauro RA, Bianchini SL, Florence RO (2011) Projeto GeoMS: melhorando o Sistema de Licenciamento Ambiental do Estado do Mato Grosso do Sul. Campinas/SP: Embrapa Informática Agropecuária, 64 p
- Silva JMC e Bates JM (2002) Biogeographic patterns and conservation in South American cerrado: a tropical savanna hotspot. BioScience, 52: 225-233
- Smith LB, Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcairnioideae). Fl Neotrop Monogr 14:1-662
- Smith LB e Downs RJ (1979) Bromelioideae (Bromelioideae). Flora Neotropica Monografia, 14: 1443-2142

- Thornton, H. E. B., J. Roncal, C. E. Lewis, J. Maschinski, and J. Francisco-Ortega (2008) Conservation Genetics of *Jacquemontia reclinata* (Convolvulaceae), an Endangered Species from Southern Florida: Implications for Restoration Management. *Biotropica* 0: 507–514
- Turchetto-Zolet AC, Segatto ALA, Turchetto C, Palma-Silva C, Freitas LB (2013). Guia prático para estudos Filogeográficos. SBG 18-19
- Turchetto-Zolet AC, Cruz F, Vendramin GG, Simon MF, Salgueiro F, Margis-Pinheiro M, Margis R. 2012. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65:174-182
- Versieux LM e Wendt T (2007) Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Conservation Genetics* 16:2989-3009
- Versieux LM, Coffani-Nunes JV, Paggi GM e Costa AF (2015) Checklist das Bromeliaceae do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Botânica. In press*
- Wörhmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, Huettel B e Weinsing K (2012) Development of 15 nuclear microsatellites markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources*, doi 10.1007/s12686-012-9738-y
- Woodward, SL (2008) Introduction to biomes. Greenwood, Westport.
- Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis, MS e Bered F (2012) Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in others bromeliads. *International Journal of Molecular Science*, 13:15859-15866

4 Artigo

Estrutura genética populacional de *Dyckia ferruginea*, Mato Grosso do Sul :

fluxo gênico baixo entre populações e implicações conservacionistas

Artigo a ser submetido para revista *Conservation Genetics*

Estrutura genética populacional de *Dyckia ferruginea*, Mato Grosso do Sul:

fluxo gênico baixo entre populações e implicações conservacionistas

GISLAINE MOREIRA DE MIRANDA ^{1,2}, LUCIANA VICENTE DA SILVA^{2,3},

FERNANDA RUSSO GODOY^{2,4} BRENDA BAÍA BRANDÃO^{1,2}, CAMILA

MARTINI ZANELLA⁵, GECELE MATOS PAGGI^{1,2,4}

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

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

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

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

⁵ National Institute of Agricultural Botany Cambridge, 16, Hopkins Close, Cambridge,
CB4 1FD Cambridge, England, Cambridgeshire, United Kingdom.

□ Gecele Matos Paggi gecele.paggi@ufms.br

Resumo

Os dados gerados por pesquisas em genética de populações podem ser utilizados para definir unidades de conservação, indicando áreas de populações de maior ou menor importância para a preservação dos táxons em questão. O presente estudo descreveu os padrões de estrutura e diversidade genética populacional e fluxo gênico para *D. ferruginea*, que ocorre em áreas de Cerrado no Mato Grosso do Sul. Foram utilizados seis marcadores de microssatélites tanto para os nucleares ($H_O=0,218$ e $H_E= 0,787$) quanto para os plastidiais ($H_E= 0,917$ a $H_E=1$; e 39 haplótipos). Foi observada grande variação genética dentro das populações tanto para os microssatélites nucleares (88,39%) quanto para os plastidiais (91,87%) com estruturação genética moderada ($F_{ST}= 0,116$). Moderados níveis de diferenciação genética entre populações foram encontrados com comparações de F_{ST} par a par variando de 0,046 a 0,110. O número de migrantes por geração foi de 0,299 a 1,308, o que mantém a coesão das populações com baixo fluxo de gênico. *D. ferruginea* é composta por apenas dois grupos genéticos. O fluxo gênico via sementes foi mais eficiente que o fluxo gênico via pólen (-1,33). *Dyckia ferruginea* apresentou baixos índices de diversidade genética e baixo fluxo gênico. Não há registros que *D. ferruginea* esteja incluída em Unidades de Conservação e que se encontra na lista de espécies ameaçadas, portanto, são necessárias estratégias de conservação da espécie para que possa garantir ao máximo a permanência dessas populações, bem como a biodiversidade do ecossistema a qual ela pertence.

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

Abstract

Data generated by research on population genetics can be used to define conservation units and properties for the management of genetic resources, indicating areas of populations of greater or lesser importance for the conservation of the taxa in question. The present study described the patterns of population structure and genetic diversity and gene flow for *D. ferruginea*, which occurs in Cerrado areas in Mato Grosso do Sul. Six microsatellite markers were used for both nuclear ($H_O = 0.218$ and $H_E = 0.787$) and plastidial ($H_E = 0.917$ to $H_E = 1.000$ and 39 haplotypes). There were significant deviations of the Hardy-Weinberg Equilibrium, with an inbreeding coefficient of 0,760. A large genetic variation was observed within the populations for both the microsatellite (88.39%) and the plastidial (91.87%) with moderate genetic structure ($F_{ST} = 0.116$). Moderate levels of genetic differentiation between populations were found with F_{ST} comparisons. The number of migrants per generation was from 0.299 to 1.308, which maintains the cohesion of populations with low gene flow. There is no record that *D. ferruginea* is included in Conservation Units and is in the list of Therefore, species conservation strategies are necessary to ensure that these populations remain as Biodiversity of the ecosystem to which it belongs.

Keywords: Bromeliaceae, conservation, gene flow, microsatellites, population genetics.

5 Introdução

A família Bromeliaceae apresenta plantas epífitas, saxícolas ou terrestres que podem habitar desde ambientes extremamente secos até matas densas, sendo considerada uma das famílias ecológica e morfologicamente mais diversas. As inovações apresentadas pelas bromélias ao longo do tempo, tais como o epifitismo, a formação de um tanque através da disposição das folhas servindo como habitat para muitos organismos, a capacidade dos tricomas foliares de absorver água e nutrientes, a polinização pelas aves e o surgimento do sistema CAM de fotossíntese (metabolismo ácido das crassuláceas), permitiram a essas plantas invadirem novos ambientes, como florestas pluviais, topo de árvores e ambientes xéricos, além de ocasionarem uma extensiva especiação (Givinish et al., 2014). São considerados quatro centros de diversidade para a família, os Andes, a América Central, o Planalto das Guianas, e o Escudo Brasileiro (Smith e Downs, 1974; Givinish et al., 2014). Estima-se que cerca de 50% do total de espécies da família possa ser encontrado no Brasil, colocando o país como um dos mais importantes em termos de diversidade de bromélias (Leme e Marigo, 1993).

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. composto por aproximadamente 160 espécies, juntamente com os gêneros *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f., *Deuterocohnia* Mez, *Fosterella* L.B Smith e *Pitcairnia* L'Hér pertencem à subfamília Pitcairnioideae (Krapp et al., 2014). As espécies de *Dyckia* são plantas perenes, de hábito terrestre ou saxícola, nas quais não se observa a formação de um tanque para o acúmulo de água (particularidade observada na maioria das espécies de Bromeliaceae), característica essa que possibilitou ao gênero sobreviver em ambientes xeromórficos.

O conhecimento da estrutura genética de populações é entendido como etapa fundamental para a realização de programas conservacionistas. Os dados gerados por pesquisas em genéticas de populações podem ser utilizados para definir unidades de

conservação e propriedades para o manejo de recursos genéticos, indicando áreas de populações de maior ou menor importância para a preservação dos táxos em questão e permitindo o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação (Cavallari et al., 2006). Portanto, a manutenção do padrão de diversidade genética para cada espécie é essencial para a preservação do potencial evolutivo (Fleishmam et al., 2001).

Em vista da importância ecológica, econômica e cultural da família Bromeliaceae, estudos sobre genética populacional têm buscado entender os padrões de variabilidade genética que levaram a processos evolutivos e têm sido fundamental para inferir estratégias de conservação, principalmente na Mata Atlântica, o centro de diversidade das bromélias (Alves et al., 2004; Barbará et al., 2007, 2009; Palma-Silva et al., 2007, 2009; Hmeljevski et al., 2011; Zanella et al., 2011, 2012; Goetze et al., 2013; Goetze et al., 2015).

A espécie *Dyckia ferruginea* MEZ é uma espécie de distribuição restrita aos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Smith e Downs, 1974; Kromer e Kessler, 1999; Versieux et al., 2015; Forzza et al., 2017; IUCN) e está inserida nos domínios do Cerrado, este complexo vem sofrendo ao longo dos anos uma forte pressão antrópica. As espécies de distribuição restrita e seus congêneres de ampla distribuição têm sido motivo de muitos estudos ao longo dos anos, pois espera-se, dado ao isolamento geográfico e pelo seu tamanho populacional reduzido que sofram abruptamente os efeitos das forças evolutivas, como endogamia, gargalo de garrafa e deriva genética, resultando em baixa diversidade genética (Gitzendanner e Soltis, 2000; Lavergne et al., 2004; Gibson et al., 2008; Ravikanth et al., 2010).

Buscando compreender os padrões de diversidade genética, estrutura genética e fluxo gênico a fim de complementar os estudos já realizados com bromélias, o objetivo

deste trabalho foi realizar estudo sobre diversidade genética e fluxo gênico em populações naturais de *Dyckia ferruginea* (Bromeliaceae) em áreas de Cerrado no estado do Mato Grosso do Sul. Nossos objetivos específicos foram: (a) Descrever a diversidade genética dentro e entre populações; (b) Identificar se há evidências genéticas de recente redução no tamanho populacional em *Dyckia ferruginea*; (c) Contribuir com informações relevantes para auxiliar estudos relacionados a conservação de bromélias.

6 Material e Métodos

6.1 Espécie e área de estudo

Dyckia ferruginea é uma espécie com 1 m de altura ou maior, quando com inflorescência, frequentemente com folhas de 80 centímetros de comprimento; apresenta bainha suborbicular com 5 centímetros de comprimento; suas lâminas são levemente triangulares coberta por escamas esbranquiçadas, contém espinhos densamente e grosseiramente serrilhados. A planta apresenta inflorescência ramificada densa ou mais ou menos interrompida, as flores se dispõem em pedicelos muito curtos, as sépalas são ovaladas, suas pétalas possuem a coloração amarelo-esverdeada e são elípticas, com estames igualando as pétalas, as anteras do verticilo são lineares raramente se apresentam encurvadas. (Kromer e Kessler, 1999). *Dyckia ferruginea* apresenta alta taxa de produção vegetativa (Kromer e Kessler, 1999) e é encontrada em áreas de Cerrado em solos rochosos secos (Smith e Downs, 1974).

É uma espécie de distribuição restrita aos estados de Mato Grosso (cidades de Cáceres e Rio Verde; Smith e Downs, 1974) e Mato Grosso do Sul (com registros na cidade de Bonito; Aquidauana, Coxim e Corguinho), (Kromer e Kessler, 1999; Versieux et al., 2015; Forzza et al., 2017; IUCN). O material foi coletado e depositado no Herbário COR *campus do pantanal*/UFMS e CGMS/UFMS, (Kromer e Kessler, 1999, Versieux et al., 2015; Forzza et al., 2017; IUCN).

O presente estudo foi realizado em áreas de Cerrado, próximo a rodovias federais do estado do Mato Grosso do Sul.

6.2 Coleta do material vegetal e extração de DNA

Foi coletado o material vegetal de cinco populações, sendo Coxim (CX), Rio Verde (R.VI), Rio Verde (R.VII), Aquidauana (AQ) e Piraputanga (PT), (Fig. 1) abrangendo um tamanho amostral de 107 indivíduos (Tabela 1).

O material coletado para este estudo foi uma folha jovem de cada indivíduo. Segundo Kromer e Kessler (1999) *Dyckia ferruginea* apresenta alta reprodução vegetativa e para evitar a amostragem de clones os indivíduos foram coletados com uma distância de no mínimo dez metros entre si. A folha coletada foi desidratada em sílica gel até o momento da extração do DNA genômico. O protocolo de extração usado foi o descrito em Doyle e Dickson (1987). Para verificar a qualidade da amostra, o DNA foi quantificado em gel de agarose 1% corado com Syber Green (Invitrogen) em comparação com o DNA de fago λ .

6.3 Marcadores moleculares nucleares e plastidiais, PCR e genotipagem

Para a análise de diversidade genética das cinco populações de *D. ferruginea*, foram testados 19 *primers* desenvolvidos para outras espécies, tais como nrSSRs (*Loci* de microssatélites): Dd03, Dd04, Dd05, Dd07, Dd11, Dd13, Dd14, Dd15, Dd18, Dd19, Dd20, *Dyckia distachya* (Zanella et al., 2012); Acom_117, Acom_71.3, Acom12.2, Acom109.6, *Dyckia marnierlapostollei* (Wöhrmann et al., 2012); Ac01, Ac11, Ac25, Ac55, *Aechmea caudata* (Goetze et al., 2013).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em volume de 10 µL contendo: 10 ng de DNA, 1X de tampão da enzima, 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP mix, 1 pmol de “primer forward”, 4 pmol de “primer reverse”, 0,4pmol de “primer” M13 marcado com diferentes fluorescências (FAM, VIC ou NED) e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Go Taq, Promega) e amplificadas em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando um programa de ciclos do tipo “touchdown” com as condições de amplificação conforme descrito por (Palma-Silva et al., 2007).

Após os testes de amplificação dos *loci* de microssatélites foram selecionados seis marcadores polimórficos (Acom_109.6; Acom_71.3; Acom_119; Ac25; Dd20 e Dd10) para as análises de um total de 96 indivíduos para cada *locus*. Os fragmentos amplificados com a fluorescência foram genotipados em sequenciador automático (ABI 3700 Applied Biosystems) pela empresa Macrogen Inc (Coréia do Sul), e comparados com padrão de tamanho molecular LIZ 500 (Applied Biosystems) usando o programa GeneMarker versão Demo 1.97 (SoftGenetics).

Foram testados 12 *loci* de microssatélites de cloroplasto (cpSSRs: (DSSR-L01;

DSSR-L04; DSSR-L06; DSSR-N01; DSSR-N04; DSSR-N05; DSSR-N07; DSSR-N10; DSSR-N11; DSSR-N15; DSSR-N16; DSSR-N18), previamente caracterizados para o gênero *Dyckia* (Krapp et al., 2012). As PCRs foram realizadas em volume de 10 µL contendo: 10 ng de DNA, 1X de tampão da enzima, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP mix, 0,04 pmol de “primer forward”, 0,16 pmol de “primer reverse”, 0,16pmol de “primer” M13 também marcado com diferentes fluorescências (VIC, FAN e NED) e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Go Taq, Promega), e foram amplificadas em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo de amplificação utilizado foi descrito por Krapp et al., (2012). Após os testes, seis fragmentos amplificados foram selecionados (DSSR-L04; DSSR-N05; DSSR- N10; DSSR-N11; DSSR-N15 e DSSR-N18) em seguida genotipados em sequenciador automático pela empresa Macrogen Inc e comparados com tamanho molecular padrão molecular LIZ 500 (Applied Biosystems) usando o programa GeneMarker versão Demo 1.97 (SoftGenetics). As análises utilizando cpSSRs foram feitas com uma amostragem total de 48 indivíduos amostradas nas cinco populações de *D. ferruginea*, sendo 8 indivíduos em CX, 13 em R.VI, 9 em R.VII, 8 em AQ e 10 indivíduos em PT.

6.4 Análises de diversidade genética

Para caracterizar os *loci* de nrDNA nas populações amostradas foram estimados: a) número de alelos por *locus*; b) heterozigosidade observada; c) heterozigosidade esperada; d) F_{IT} - coeficiente total de endogamia; e) F_{IS} – coeficiente de endocruzamento. Estes parâmetros foram estimados através dos programas MSA

(Dieringer e Schlotterer, 2003) e FSTAT 1.2 (Goudet, 1995). Cada *locus* foi testado para desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o programa FSTAT 1.2 (Goudet, 1995). Para a análise da estrutura genética das populações foi utilizada a estatística F para estimar a diversidade genética dentro e entre as populações e inferir o grau de subdivisão das mesmas no software Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2010). Foram realizadas análises de variância molecular (AMOVA) para identificar os padrões de estruturação genética hierárquica no programa Arlequin 3.01. Também foi realizada uma análise Bayesiana para estimar o número de grupos genéticos (K) através do programa Structure 2.3.2 (Pritchard et al., 2000). Para determinar o número de grupos genéticos utilizou-se o critério proposto por Evanno et al., (2005), utilizando o programa Structure Harvester v.06.93 (Earl e Von Hold, 2012).

A estruturação genética das populações foi avaliada de acordo com as estimativas de F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) calculada no Genalex 6.5.01 (Peakall e Smouse, 2012). A análise de diferenciação genética par a par entre as populações também foi realizada no Genalex 6.5.01 (Peakall e Smouse, 2012). O número efetivo de migrantes (N_m) entre as populações foi calculado com base na teoria coalescente usando a inferência Bayesiana com o MIGRATE v3.2.1 (Beerli, 2006).

Para avaliar se houve uma recente redução no tamanho das populações de *Dyckia ferruginea*, nós utilizamos o programa BOTTLENECK v1.2.02 (Piry et al., 1999). A significância dos resultados foi determinada através do teste de Wilcoxon *onetail* e 10.000 iterações (Cornuet e Luikart 1996). Por serem mais apropriados para marcadores de microssatélites, foi utilizado os modelos S.M.M. (step-wise mutation) e T.P.M (two-phase model), com 95% *single-step mutations* em T.P.M. e variância entre os passos de 12 (Piry et al., 1999).

Cada população foi caracterizada por níveis de diversidade genética em marcadores de cpDNA utilizando: (1) o número de haplótipos detectado em cada fragmento da amostra, (2) diversidade de gene - H_E (Nei, 1978) e (3) riqueza alélica estimada (El Mousadik e Petit, 1996), utilizando o programa Rarefac v. 3.5 (Petit et al., 1998). A análise da variância molecular (AMOVA) foi realizada no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010), para avaliar a distribuição da variação genética interespecífica.

Alelos nulos, grandes alelos “dropout” e erros de sequências sujas foram analisados através do programa Micro-checker (Oosterhout et al., 2004).

6.5 Fluxo gênico via dispersão de pólen e semente

A fórmula de Ennos (1994) abaixo foi aplicada para estimar a contribuição do fluxo de pólen versus fluxo de semente sobre o fluxo gênico total.

$$\text{Fluxo de pólen/fluxo de sementes} = \frac{\left(\frac{1}{F_{ST}(b)} - 1\right) - 2\left(\frac{1}{F_{ST}(m)} - 1\right)}{\left(\frac{1}{F_{ST}(m)} - 1\right)}$$

$F_{ST}(b)$ e $F_{ST}(m)$ correspondem aos níveis de diferenciação populacional calculados a partir de marcadores herdados de forma biparental (nuclear) e materna (cpDNA), respectivamente. Esse cálculo foi baseado no pressuposto da herança materna de cpDNA em *D. ferruginea* como é na maioria das angiospermas (Ennos et al., 1999).

7 Resultados

7.1 Diversidade e estrutura genética nuclear

Foram detectados 69 alelos nos seis *loci* analisados em *Dyckia ferruginea*, representando uma média de 15,7 alelos por *locus*, variando de 11 a 25 (Tabela 2). A

heterozigosidade observada e esperada para todos os *loci* variou de 0,053 a 0,350 e de 0,678 a 0,886 respectivamente e uma expressiva diferença na média de heterozigosidade observada e esperada 0,218 e 0,787 (Tabela 2). O coeficiente total de endogamia (F_{IT}) foi positivo para todos os *loci*. O índice de fixação (F_{ST}) apresentou o valor médio de 0,105 e variou entre 0,055 a 0,170. O coeficiente de endocruzamento médio (F_{IS}) foi de 0,760, (Tabela 2). Todos os *loci* apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,001$). Os resultados deram negativos para alelos nulos, grandes alelos “dropout”, e erros de sequências sujas.

Os resultados obtidos para os índices de diversidade encontrados nas populações de *D. ferruginea* mostraram uma riqueza alélica variando de 5,406 a 6,512. A população Rio Verde I (R.VI) apresentou o maior número de alelos (53), enquanto que a população com menor número de alelos (33) foi a da Piraputanga (PT). A população R.VII apresentou o maior número de alelos privados (11 alelos), seguido das populações de Aquidauana (AQ) que apresentou 7 alelos privados, Coxim (CX) e Piraputanga (PT) com 4 alelos privados e Rio Verde I (R.VI) com o menor número de alelos privados (3). Os resultados obtidos também mostraram um alto valor de riqueza alélica nas cinco populações de *D. ferruginea*, variando de 5,40 a 6,51 sendo que CX, R.VI e AQ apresentaram a maior riqueza alélica entre as populações, respectivamente (Tabela 3). Os valores de heterozigosidade observada variaram de 0,102 a 0,520 em CX e R.VII, respectivamente, e de heterozigosidade esperada de 0,726 a 0,829 em R.VII e CX, respectivamente. O coeficiente de endocruzamento apresentou valores significativos para todas as populações (Tabela 3).

Os resultados da análise Bayesiana indicaram um $K=2$ entre as cinco populações de *D. ferruginea* (Fig. 2,3). O grupo genético 1 predominou nas populações CX e PT e o

grupo 2 predominou na população R.VI e R.VII enquanto que a população de AQ apresenta uma sobreposição intermediária.

As populações de *D. ferruginea* de forma geral apresentaram estruturação genética moderada (S Wright, 1978), com $F_{ST}=0,121$ ($p<0,05$). Na análise de diferenciação genética par a par entre as populações, encontramos evidências de estruturação genética moderada em todas as populações, com exceção da comparação entre as populações de

Aquidauana e Piraputanga que não apresentou diferenciação genética entre elas (Tabela 4). As populações de RVI e RVII apresentaram os maiores valores de diferenciação quando comparada com as demais populações (Tabela 4). O número de migrantes foi próximo de 1 ($Nm=0,932$), o que demonstra um baixo fluxo gênico entre as populações. Quando comparadas umas com as outras, o resultado revelou que todas as populações tiveram baixa taxa no número efetivo de migrantes entre as populações, o que reflete a estruturação encontrada entre as populações (Fig. 4).

A análise de variância molecular (AMOVA) das populações de *D. ferruginea* para microssatélites nucleares mostrou que a maior proporção da variação genética ocorre devido a diferenças dentro das populações (88,39%) e a menor entre as populações (11,61%) (Tabela 5).

Foram encontradas evidências de bottleneck (excesso de heterozigosidade) apenas na população de Piraputanga, $p= 0,02344$ e $0,03906$, nos modelos T.P.M. e S.M.M., respectivamente. As demais populações não apresentaram indícios de uma recente redução do tamanho populacional.

7.2 Diversidade e estrutura genética Plastidial e fluxo gênico via dispersão de

pólen e semente Seis *loci* de microssatélites de cloroplasto descritos para o gênero *Dyckia* amplificaram satisfatoriamente em *Dyckia ferruginea*. Todas as populações mostraram-se polimórficas, apresentando de 8 a 12 haplótipos cada (Tabela 3). As populações R.VI e R.VII mostraram-se as mais diversas com 12 e 9 haplótipos, enquanto que as populações CX, AQ e PT apresentaram os mesmos haplótipos. *D. ferruginea* apresentou altos níveis de diversidade gênica (H_E) variando de 0,917 a 1,000. A riqueza alélica foi 7,000 nas populações CX, R.VI e R.VII, enquanto que na AQ a riqueza foi 6,222, já em PT foi de 5,33 (Tabela 3). Trinta e nove haplótipos foram encontrados nas cinco populações amostradas, sendo 32 deles únicos. Dos 39 haplótipos encontrados nas duas populações de *D. ferruginea* cinco são compartilhados entre elas: H1, H16, H17, H26 e H32 (Tabela 6). Os háplótipos H1, H16, H17, H18, H32 e H36 são os mais frequentes (Tabela 6).

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a menor proporção da variação genética (8,121%) pode ser atribuída a variação entre populações, enquanto que a maior variação ocorre dentro das populações (91,878%), (Tabela 5).

Com base nos valores estimados do F_{ST} da análise de variância molecular entre as populações para marcadores de microssatélites nucleares (0,116) e plastidial (0,081) foi estimada a taxa de fluxo de pólen em relação ao fluxo de semente, a qual foi de -1,33.

8 Discussão

8.1 Diversidade e estrutura genética nuclear

Os resultados de diversidade genética obtidos para *Dyckia ferruginea* revelaram uma baixa diversidade genética ($H_O=0,218$), com valores próximos aos observados para

outras espécies de bromélias, como os estudos realizados com *Alcantarea glaziouana* ($H_O = 0,299$; Barbará et al., 2009), maiores que aos encontrados em populações de *Alcantarea regina* com valores de ($H_O = 0,178$; Barbará et al., 2009) e inferiores aos observados em *Aechmea caudata* ($H_O = 0,467$; Goetze et al., 2013), *Vriesea gigantea* ($H_O = 0,424$; Palma-Silva et al., 2009) e *Alcantarea regina* ($H_O = 0,485$; Barbará et al., 2009), *Alcantarea geniculata* ($H_O = 0,357$; Barbará et al., 2007), *Alcantarea imperialis* ($H_O = 0,362$; Barbará et al., 2007) e *Bromelia antiacantha* ($H_O = 0,335$; Zanella et al., 2011). Espécies com distribuição geográfica restrita geralmente apresentam níveis mais baixos de diversidade genética que espécies relacionadas com uma distribuição geográfica mais ampla (Gitzendanner et al., 2000).

Dyckia ferruginea exibiu um excesso de genótipos homozigotos em todas as populações avaliadas, apresentando um coeficiente de endocruzamento alto ($F_{IS} = 0,760$) e superior ao encontrado para outras bromélias como *B. antiacantha* ($F_{IS} = 0,431$; Zanella et al., 2011) e *Vriesea gigantea* ($F_{IS} = 0,269$; Palma-Silva et al., 2009). O alto coeficiente de endocruzamento e os baixos índices de diversidade apresentados indicam a limitação no deslocamento dos polinizadores e dos dispersores de sementes (Goetze et al., 2015).

O índice de riqueza alélica foi significativo entre as populações de *D. ferruginea*. Todas as populações apresentaram alelos privados, em destaque estão as populações de R.VII e AQ com os maiores índices. Além dos alelos privados a população de R.VII apresentou o maior índice de diversidade genética.

Os resultados dos índices de diferenciação genética sugerem níveis moderados de diferenciação genética entre as populações de *D. ferruginea* ($F_{ST} = 0,116$). Próximos

ao encontrados em *D. leptostachya* (Brandão, 2017) com $F_{ST} = 0,101$, em *Alcantarea geniculata* (Barbará et al., 2007) com o $F_{ST} = 0,111$ e *Aechmea winkleri* (Goetze et al., 2015) com $F_{ST} = 0,032$ indicando estruturação moderada.

A análise bayesiana revelou que *D. ferruginea* é composta por dois grupos genéticos (Fig. 2) e a análise apresenta indivíduos dos dois grupos genéticos misturados entre as cinco populações, porém a população de Aquidauana apresentou o maior grau de mistura genética. A maior variação molecular foi observada dentro das populações de *D. ferruginea* (88,39%), assim como estudos feitos com populações de *Aechmea winkleri* que observou ocorrência de alta porcentagem de variação molecular dentro das populações (96,64%), bem como em *Bromelia hieronymi* (96,64%; Godoy, 2016) e em *Dyckia leptostachya* (91,62%; Brandão, 2017) e apesar das populações de *A. winkleri*, *B. hieronymi* e *D. leptostachya* não estarem geneticamente bem estruturadas, houve a formação de dois grupos genéticos na análise bayesiana (Goetze et al., 2015; Godoy, 2016; Brandão, 2017) como observado em *D. ferruginea*. O número de migrantes nessas três espécies estudadas foi superior aos encontrados em *D. ferruginea*, apresentando elevados níveis de fluxo gênico enquanto que em *D. ferruginea* o fluxo gênico foi baixo.

De acordo com os resultados do F_{ST} para a par, a distância euclidiana entre as populações não pode explicar a estruturação genética encontrada, já que as populações de Aquidauana e Piraputanga que estão a 72 km de distância não apresentaram estruturação genética, enquanto que as populações de Coxim e Rio Verde I que estão a 21 km de distância apresentaram estruturação genética moderada. Além disso, as populações de RVI e RVII apresentaram os maiores valores de diferenciação genética. Essa diferenciação indica que estas duas populações estão mais isoladas das demais, não só pela distância, mas provavelmente por algum tipo de barreira como distância geográfica e barreira biológica que está restringindo o fluxo gênico das populações de

RVI e RVII para as outras populações. Embora as populações de AQ e PT não tenham se estruturado, apresentaram baixa taxa de migrantes entre elas, o que pode ser justificado pelo número de indivíduos da população de PT ser menor quando comparada com as demais, no entanto uma nova análise deve ser feita para confirmar se essas populações realmente não estejam estruturadas.

A única população de *Dyckia ferruginea* que apresentou evidências de bottleneck genético está localizada no distrito de Piraputanga e teria, portanto, experimentado uma redução do número efetivo populacional provavelmente durante os anos de 1900 e 1950. Durante esse período, a região foi marcada por grandes mudanças como a construção da ferrovia que foi inaugurada em 1912 (Finger, 2014). A estação ferroviária deu condições para fixação de famílias e trouxe desenvolvimento para região. Como a população de *D. ferruginea* encontra-se a cerca de um quilômetro da ferrovia e cerca de três quilômetros do distrito de Piraputanga, provavelmente pode ter passado por uma redução do tamanho efetivo populacional durante o período de desenvolvimento econômico da região.

8.2 Diversidade genética plastidial e fluxo gênico via dispersão de pólen e sementes

Embora *Dyckia ferruginea* tenha apresentado alta diversidade gênica com média de $H_E=0,977$, valor superior ao encontrado com outros estudos de bromélias como em *V. gigantea* $H_E=0,486$ e em *B. Hieronymi* $H_E=0,807$, teve um baixo compartilhamento de haplótipos entre as populações (Figura 6), porém se comparado com as espécies citadas acima (*V. gigantea*; número de Haplótipos= 13 e *B. Hieronymi*; número de Haplótipos= 19) o número de haplótipos foi bem maior. Já a riqueza alélica encontrada neste estudo variou de 1,000 a 2,000, foi próxima à encontrada para *V. gigantea*, (0,412 a 2,810).

A razão entre fluxo de pólen e de sementes através dos valores estimados do F_{ST} para marcadores de microssatélites nucleares (0,116) e plastidial (0,081) foi -1,33 para *D. ferruginea*, ou seja, fluxo gênico mais eficiente via sementes. Normalmente observa-se que no gênero *Dyckia*, as sementes são dispersas pelo vento, ou pela água no caso de algumas espécies adaptadas a ambientes periodicamente inundados, como a *Dyckia brevifolia* Baker (Leme et al., 2012). Sementes dispersas pelo vento promovem o deslocamento de alelos dentro das populações e eventualmente entre as populações (Fischer et al., 2000) esse fator pode justificar a maior variação molecular dentro das populações estudadas. Neste trabalho não foi feito estudos da frequência de polinizadores nas populações de *D. ferruginea*, no entanto, o gênero *Dyckia* apresenta geralmente como polinizadores principais os beija-flores, mas insetos como abelhas e borboletas também já foram relatados (Rogalski et al., 2009; Vosgueritchian et al., 2006). Algum tipo de barreira pode existir, isolando algumas populações uma das outras como a R.VI e R.VII que apresentaram maior diferenciação genética quando comparada com as demais, esse fator pode prejudicar a eficiência do fluxo gênico através dos polinizadores.

8.3 Conservação

As populações de *D. ferruginea* se concentram próximas a rodovias federais e cidades do Mato Grosso do Sul. O estado apresenta como principal fonte econômica a agropecuária. A substituição de grandes áreas de vegetação natural por ecossistemas diferentes, como pastagens e campos agrícolas, leva à criação de fragmentos isolados, imersos em uma matriz antrópica (Forman e Godron 1986; Franklin, 1993). A criação de fragmentos implica na formação de uma borda florestal, definida como uma região

de contato entre a área ocupada (matriz antrópica) e o fragmento de vegetação natural (Williams-Linera et al., 1997; Primack e Rodriguez 2001), promovendo alteração nos parâmetros físicos, químicos e biológicos do sistema, como disponibilidade energética e fluxo de organismos entre tais ambientes (Wiens et al., 1993).

Visto a importância de se preservar populações naturais que provavelmente estejam ameaçadas e considerando que até o momento não há registros que a espécie *D. ferruginea* esteja inserida em alguma Unidade de Conservação, este trabalho ressalva a priorização de três populações naturais para conservação de seus genótipos. Sendo elas a R.VII por apresentar o maior número de alelos privados, a AQ que além de apresentar altos índices de alelos privados, não apresenta estruturação genética quando comparada com PT e a própria população de PT por apresentar redução populacional.

A população de Piraputanga apresentou redução populacional provavelmente decorrente do desenvolvimento econômico da região e/ou devido a fragmentação do habitat, que representa uma ameaça para muitos ecossistemas (Young et al., 1996). Muitas vezes vem acompanhada da redução do tamanho populacional, ocasionando um gargalo genético, onde os indivíduos remanescentes apresentarão apenas uma amostra do pool gênico original (Young et al., 1996). Aliado a isso, quanto menor for o número de indivíduos no local de ocorrência de uma determinada espécie, maior é a chance dela se tornar extinta devido a fatores estocásticos (Frankham et al., 2008; Gauthier et al., 2010).

Estudos de diversidade genética com *Dyckia distachya* (Janke, 2014) uma espécie que foi reintroduzida na natureza e com espécies do gênero *Encholirium*, *E. biflorum* e *E. pedicellatum* (Cavallari et al., 2006) revelaram que estas espécies estão criticamente ameaçadas de extinção, e a retirada de um único indivíduo do habitat

implica em perda significativa da diversidade genética na natureza, e, portanto, deve ser evitada.

Ao considerar os resultados discutidos neste estudo e tendo em conta que *D. ferruginea* é uma bromélia rara, restrita aos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, que apresentou baixos índices de diversidade genética e baixo fluxo Gênico. A manutenção, portanto, de todas as populações existentes *in situ* é necessária para a sua conservação e para que a diversidade genética observada nas populações não seja perdida a médio e longo prazo.

9 Conclusões

Nossos resultados mostraram que as populações de *Dyckia ferruginea* apresentam baixos índices de diversidade genética e baixo fluxo gênico. A soma dos fatores como distribuição restrita da espécie, distância geográfica e fragmentação do hábitat pode justificar os resultados dos baixos índices encontrados. Os níveis moderados de estruturação genética permitem inferir que as populações foram fundadas por indivíduos geneticamente diversos e que foram capazes de manter a diversidade ao longo do tempo. Não encontramos registros que *D. ferruginea* esteja incluída em Unidades de Conservação e que se encontra na lista de espécies ameaçadas (Forzza et al., 2017; IUCN), por esse motivo são necessárias estratégias de conservação da espécie para que possa garantir ao máximo a permanência dessas populações, bem como a biodiversidade do ecossistema a qual ela pertence.

10 Referências bibliográficas

- Alves GM, Filho AR, Puchalski A, Reis MS, Nodari RO, Guerra MP (2004) Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic forest. *Plant Genet Resour*, 2:23-28
- Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical “inselbergs”: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany*, 103: 65-77
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16: 3759-3767
- Brandão BB (2017) Conservação, diversidade e estrutura genética de populações de *Dyckia leptostachya* Baker (Bromeliaceae), 74 p. Tese (mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul Instituto de Biociências - Programa de PósGraduação em Biologia Vegetal
- Berli P (2006) Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, 22:341-345
- 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: 4357-4373
- Cornuet JM, e Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001-2014

- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA) a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3: 167–169
- Doyle JJ, Dickson EE (1987) Preservation of Plant Samples for DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Taxon*, 36:715-722
- Earl, DA, Von Hold, BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree *Argania spinosa* (L) Skeels endemic to Morocco. *Theor Appl Genet*, 92: 832–839
- Ennos RA, Sinclair WT, Hu X-S, Langdon A (1999) Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. Pp. 1-19. In: PM Hollingsworth, RM Bateman, RJ Gornall (Eds.). *Molecular systematics and Plant Evolution*. The Systematics Association, Taylor e Francis Group
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plantpopulation. *Heredity*, 72: 250-259
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, 10:564-567
- Finger AE (2014) Um século de estradas de ferro: arquiteturas das ferrovias no Brasil entre 1852 e 1957. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília – Unb – Brasília
- Fischer M, Husi R, Prati D, Peintinger M, Kleunen MV e Schmid B (2000) RAPD

- variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *Am J Bot*, 87: 1128-1137
- Fleishman E, Launer AE, Switky KR (2001) Rule and exceptions in conservation genetics – genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. *Biological Conservation*, 98: 45-53
- Forman RTT e Godron M (1986) *Landscape ecology*. John Wiley e Sons, New York, 620 pp
- Forzza RC, Costa A, Siqueira Filho JA, Martinelli G, Monteiro RF, Santos-Silva F, Saraiva DP, Paixão-Souza B, Louzada RB, Versieux L. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB27642>>. Acesso em: 10 junho de 2017
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) *Fundamentos de genética da conservação*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 280p
- Franklin JF (1993) Preserving biodiversity: species, ecosystems, or landscapes? *Ecological Applications*, 3: 202-205
- Gauthier P, Debussche M, Thompson JD (2010) Regional priority setting for rare species based on a method combining three criteria. *Biological Conservation*, 143: 1501–1509
- Gibson JP, Rice SA, Stucke CM (2008) Comparison of population Genetic Diversity Between a Rare, Narrowly Distributed Species and a Common, Widespread Species of *Alnus* (Betulaceae). *American Journal of Botany*, 95(5): 588-59
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of Genetic Variation in Rare and Widespread Plant Congeners. *American Journal of botany*, 87 (6): 783-792
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA,

- Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evan TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ (2014) Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71: 55–78
- Godoy FMR (2016) Diversidade Genética e Sistema Reprodutivo de Populações Naturais de *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae) Chaco Brasileiro, 72p. Tese (mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul Instituto de Biociências - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48:194-198
- Goetze M, Büttow VM, Zanella MC, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro GF, Sampaio ATJ, Palma-Silva, Cidade FW, Bered F (2015) Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58: 204-2010
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2) A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486
- Hmeljevski KV, Reis A, Montagna T, Reis MS (2011) Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from southern Brazil. *Conservation Genetics*, 12: 761-769 IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org> Janke A (2014) Sucesso reprodutivo, diversidade genética e fluxo de pólen de *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae), uma espécie altamente ameaçada de extinção.

- Tese (Doutorado) 104 p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Biociências Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
- Krapp F, Wohrmannt, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Leme EMC, e Weising K A (2012) Set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. Plant Molecular Systematics, Department of Sciences, University of Kassel, D-34132
- Krapp F, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Huettel B, e Weising K (2014) Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. Plant Systematic and Evolution, DOI 10.1007/s00606-014-0985-0
- Kromer, T e Kessler, M (1999) Checklist of Bolivian Bromeliaceae with Notes on Species Distribution and Levels of Endemism. Selbyana, 20 (2): 201-223
- Lavergne S, Thompson JD, Garnier E, Debussche M (2004) The biology and Ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. OIKOS, 107: 505-518
- Leme EMC, Ribeiro OBC e Miranda ZJG (2012) New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. Phytotaxa 67:9-37
- Leme EMC e Marigo LC (1993) Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro, 183 pp Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v. 403, p. 853-858
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583–590
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4, 535–538, DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684. x

- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F e Bodanese-Zanettini MH (2009) Rangeswide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in a Neotropical forest species, *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). *Heredity* 103: 503-512
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and crossamplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*, 7: 654-657
- Peakall R, Smouse PE GenAlEx 6.5 (2012) Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19):2537–9. pmid:22820204
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol*, 12: 844–855
- Piry S, Luikart G, Cornuet J M (1999) Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of heredity*, 90(4), 502-503
- Primack RB e Rodriguez E (2001). *Biologia da Conservação*. Gráfica e Editora Midiograf. Londrina, PA, 327 pp
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959
- Ravikanth G, Nageswara-Rao M, Narwade A, Shaanker RU, Ganeshiah KN (2010) Do endemic Rattans Have Lower Genetic Variability than Their Co-generic and Conspecific Non-Endemic Rattans? *Gene, Genomes and Genomic*, 4 (Special Issue 1):2227

- Rogalski JM, Reis A, Dos Reis MS e K, Hmeljevski V (2009) Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 32: 691-702
- Smith LB e Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcairnioideae). *Flora Neotropica Monografia*, 14: 1662
- Smith LB e Downs RJ (1979) Bromelioideae (Bromelioideae). *Flora Neotropica Monografia*, 14: 1443-2142
- S Wright. 1978. *Evolution and the genetics of populations. Volume 4 – Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press, Chicago
- Versieux LM, Coffani-Nunes JV, Paggi GM e Costa AF (2015) Checklist das Bromeliaceae do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Botânica. In press.*
- Vosgueritchian SB, Buzato S (2006) Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* Vell. Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 433-442
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370
- Wiens JA, Stenseth NC, Van Horne B, Ims RA (1993) Ecological mechanisms and landscape ecology, *Oikos* 66: 369-380
- Williams-Linera G, Domínguez-Gastelú V, e García-Zurita ME (1997) Microenvironment and floristics of different edges in a fragmented tropical rainforest. *Conservation Biology*, 12: 1091-1102
- Wörhmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, Huettel B e Weinsing K (2012) Development of 15 nuclear microsatellites markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources*, DOI 10.1007/s12686-012-9738-y

Young AG, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology e Evolution*, 11: 413–418

Zanella CM, Bruxel M, Paggi MG, Goetze M, Buttow VM, Cidade WF, Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, 98(9): 1511-1519

Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis, MS e Bered F (2012) Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in others bromeliads. *International Journal of Molecular Science*, 13:15859-15866

11 Legenda das Figuras

Figura 1. Pontos de coletas da espécie *D. ferruginea* no estado do Mato Grosso do Sul, (CX-Coxim; R.VI-Rio Verde; RVII-Rio Verde; AQ-Aquidauana e PT-Piraputanga).

Figura 2. Estruturação genética das populações de *D. ferruginea* através da análise bayesiana de agrupamentos para o modelo populacional de $K=2$.

Figura 3. Magnitude de ΔK da análise da estrutura de K (média \pm SD mais de 10 repetições) calculo seguindo o método ΔK proposto por Evanno et al., (2005), para os dados de *D. ferruginea* utilizando microssatélites nucleares. Os valores modais destas distribuições indicam o verdadeiro K ou o mais alto nível de estrutura “2 clusters

genéticos”. **Figura 4.** Número efetivo de migrantes entre as populações. (A) e (B) Número de emigrantes: setas saindo da população. Número de imigrantes: setas chegando. CX (Coxim), R.VI(Rio Verde I), R.VII (Rio Verde II) AQ (Aquidauana), PT (Piraputanga).

Tabela 1. Localização e tamanho amostral das cinco populações estudadas de *D. ferruginea*.

População	Tamanho Amostrai	Latitude S	Longitude W
Coxim (CX)	28	18° 45' 29.7	54° 49' 27.5
Rio Verde (R.VI)	25	18° 56' 19.7	54° 53' 17.6
		18° 56' 22.8	54° 53' 17.5
Rio Verde (R.VII)	20	19° 07' 13.5	55° 02' 45.6
Aquidauana (AQ)	24	19° 53' 36.5	55° 17' 29.5
		19° 53' 35.3	55° 17' 30.5
Piraputanga (PT)	10	20° 27' 27.4	55° 29' 13.5
Total	107		

Tabela 2. Caracterização genética e sumário da estatística F , para seis loci de microssatélites nucleares, em cinco populações de *Dyckia ferruginea*.

<i>Loci</i>	N	A	H_O	H_E	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
Acom_109.6	96	11	0,108	0,678	0,882	0,170	0,859 *
Ac25	96	15	0,192	0,842	0,818	0,055	0,808 *
Acom_71.3	96	25	0,341	0,886	0,740	0,061	0,721 *
Dd20	96	17	0,263	0,776	0,668	0,078	0,640 *
Acom_119.1	96	13	0,350	0,830	0,628	0,098	0,591 *
Dd10	96	13	0,053	0,710	0,948	0,167	0,938 *
Total/Média	96	15,7	0,218	0,787	0,781	0,105	0,760

N= tamanho da amostra; A= número de alelos por *loci*; (H_O) = heterozigosidade observada; (H_E) = heterozigosidade esperada; F_{IT} = coeficiente total de endogamia; F_{ST} = índice de fixação; F_{IS} = coeficiente de endocruzamento; (*) = Equilíbrio de Hardy-Weinberg, $P < 0,001$.

Tabela 3. Diversidade genética nuclear e plastidial nas populações de *Dyckia ferruginea* incluindo número de indivíduos amostrados (N) o número de alelos (A), alelos privados (A_P), riqueza alélica (R_S), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), tamanho da amostra (N); número de haplótipos (NH), diversidade gênica (H_E) e riqueza alélica.

Populações	nrDNA							cpDNA				
	N	A	A_P	R_S	H_O	H_E	F_{IS}	N	NH	H_E (desvio padrão)	Riqueza Alélica	
CX	23	51	4	6,512	0,102	0,829	0,879*	8	8	1,000 (0,063)	7,000	
R.V I	25	53	3	6,102	0,241	0,786	0,699*	13	12	1,000 (0,034)	7,000	
R.V II	19	45	11	5,559	0,520	0,726	0,662*	9	9	1,000(0,052)	7,000	
AQ	19	45	7	6,144	0,176	0,801	0,786*	8	8	0,972 (0,064)	6,222	
PT	10	33	4	5,406	0,230	0,793	0,610*	10	8	0,917(0,092)	5,333	

*Valores significativos para $P < 0,001$, indicando que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4. Estimativa de F_{ST} par a par entre populações de *D.*

ferruginea (diagonal inferior) e valor de probabilidade (diagonal superior) com base em 6 loci de microssatélites.

	CX	RVI	RVII	AQ	PT
CX	-	0.001	0.001	0.006	0.013
RVI	0.090	-	0.001	0.001	0.001
RVII	0.089	0.057	-	0.001	0.001
AQ	0.046	0.089	0.081	-	0.086
PT	0.065	0.110	0.107	0.052	-

Tabela 5. Análise de microssatélites nucleares e plastidiais da variância molecular (AMOVA) para *Dyckia ferruginea*.

Fonte de Variação	g.l.	Comprovante de Variação	Porcentagem de Variação	F_{ST}	Valor de P
Microssatélites Nucleares					
Entre populações	4	0,14992	11,61	0,116*	P<0,001
Dentro das populações	187	1,14156	88,39		P<0,001
Microssatélites Plastidiais					
Entre as populações	15	0,180	8,12	0,081*	P<0,001
Dentro das Populações	89	2,041	91,87		P<0,001

*Valores estatisticamente significativos para $P < 0,001$.

Tabela 6. Frequência de haplótipos de cpDNA em cinco populações analisadas de *D.**ferruginea*. (N) = número de indivíduos amostrados, por população.

Haplótipos	Populações				
	CX (8)	R.VI (13)	R.VII (9)	AQ (8)	PT (10)
H1	1	1			
H2	1				
H3	1				
H4	1				
H5	1				
H6	1				
H7	1				
H8	1				
H9		1			
H10		1			
H11		1			
H12		1			
H13		1			
H14		1			
H15		1			
H16		1			1
H17		1	1		
H18		1	1		
H19		1			
H20		1			
H21			1		
H22			1		
H23			1		
H24			1		
H25			1		
H26			1	1	
H27			1		
H28				1	
H29				1	
H30				1	
H31				1	
H32				2	1
H33				1	
H34				1	1
H35					1
H36					3
H37					1
H38					1
H39					1

Fig. 1

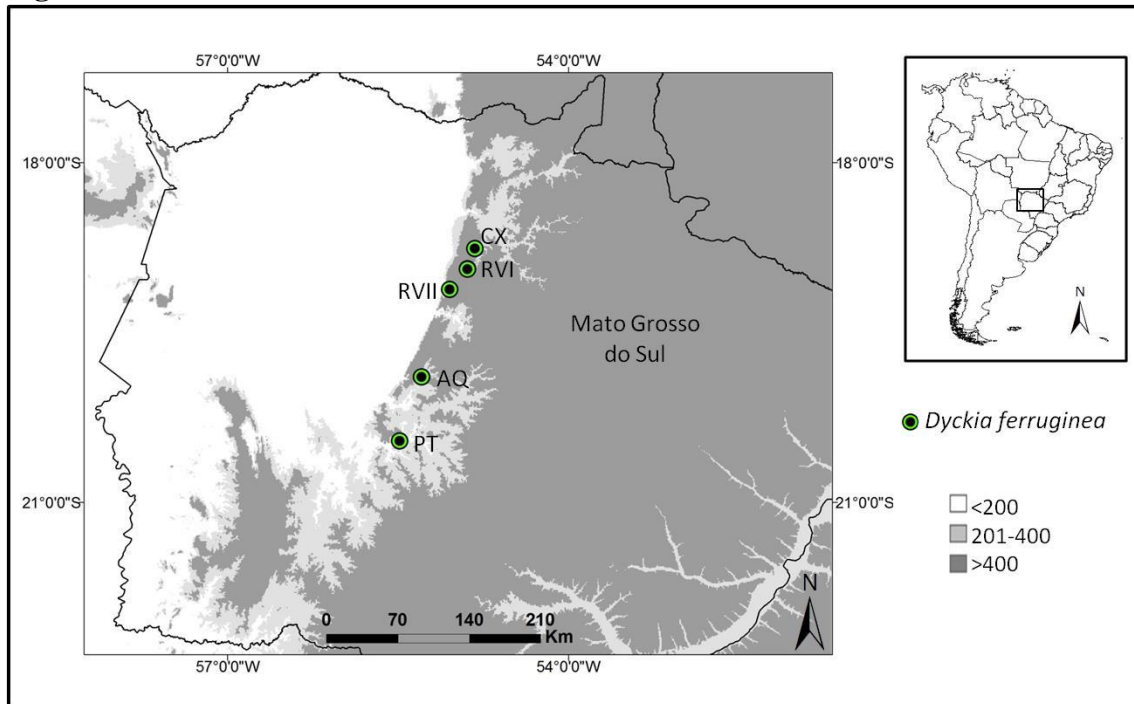


Fig. 2

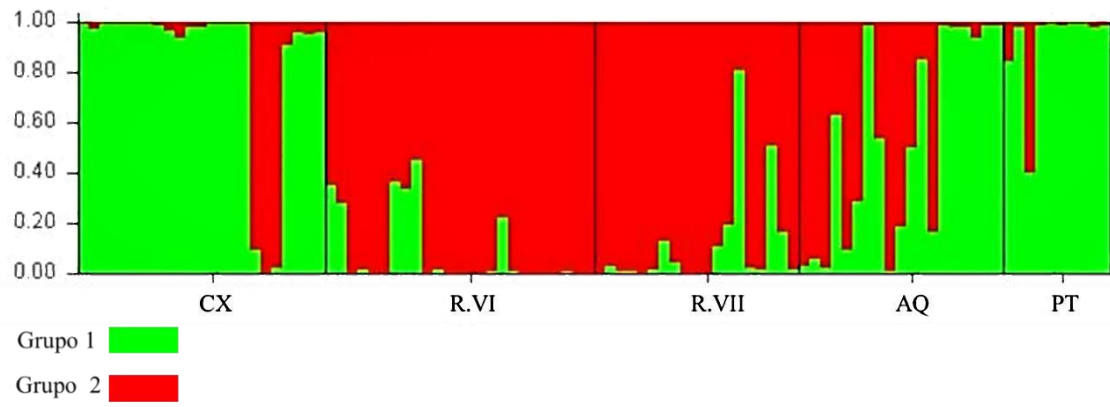


Fig.3

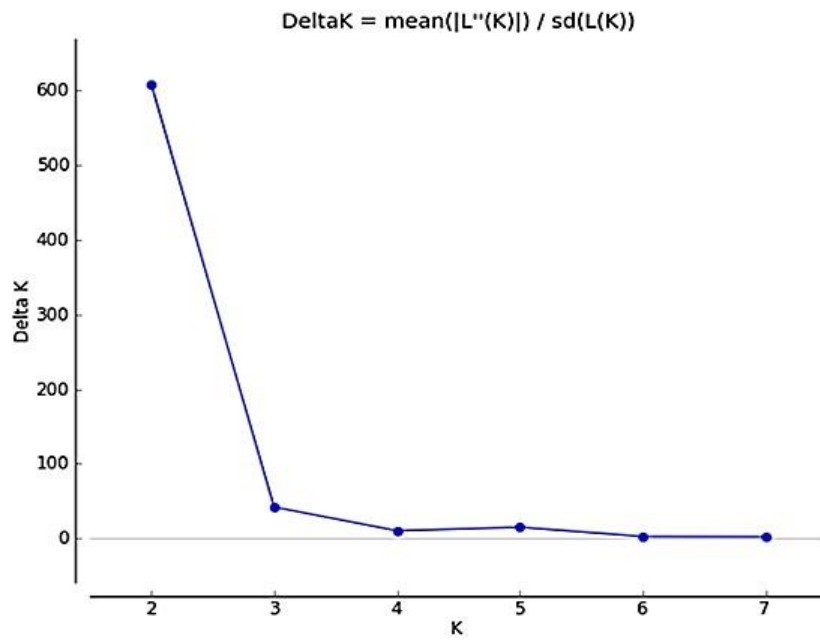
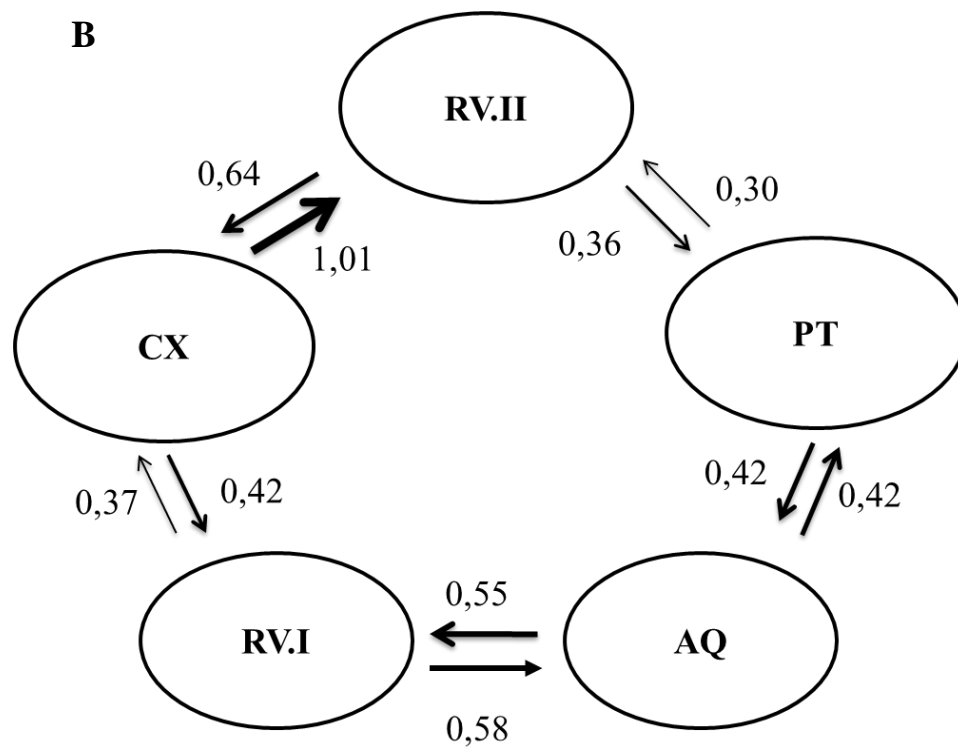
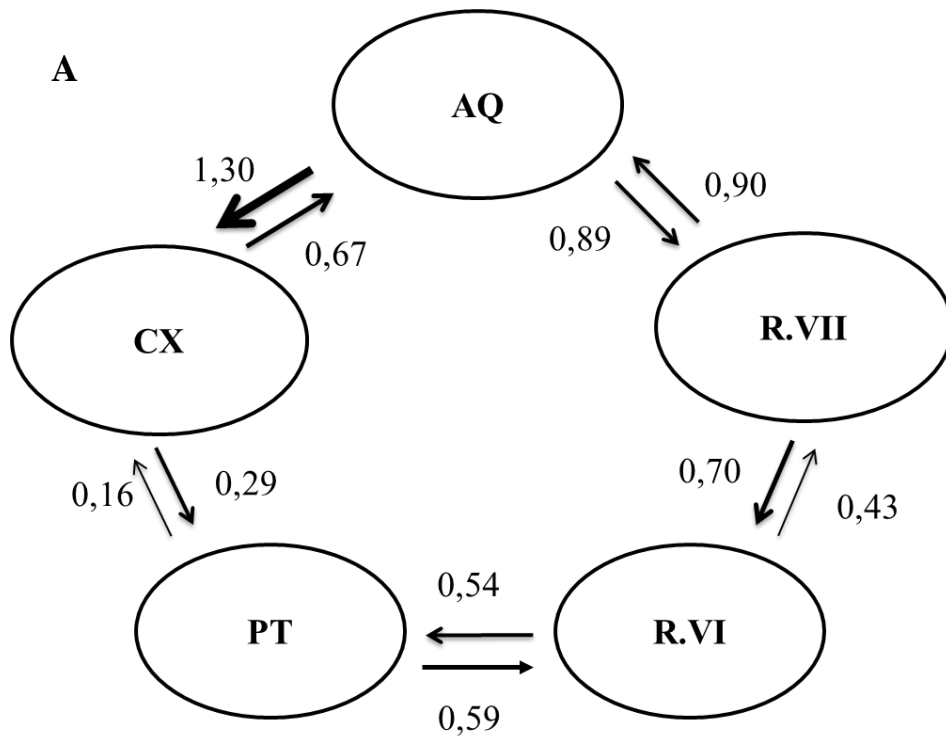


Fig. 4



12 Considerações Finais

Este trabalho descreve os padrões de diversidade genética e estrutura genética de *Dyckia ferruginea*, uma espécie de distribuição restrita aos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, que ocorre em afloramentos rochosos ferruginosos, áreas com altos níveis de insolação, grande amplitude térmica e ausência de solo, impondo condições ambientais severas à espécie.

Para descrever a diversidade genética de *Dyckia ferruginea*, utilizou-se marcadores de microssatélites nucleares que foram descritos para outras espécies de Bromeliaceae e marcadores de microssatélites plastidiais descritos para o gênero *Dyckia*. Através das análises genéticas, este estudo demonstrou que a espécie apresenta baixos níveis de diversidade genética em comparação com os encontrados em outras espécies de bromélias. *Dyckia ferruginea* apresentou uma estruturação populacional moderada, com baixa diferenciação genética entre a maioria das populações exceto em AQ e PT, porém todas as populações apresentaram baixo fluxo gênico incluindo AQ e PT.O, sendo o sistema de dispersão via sementes entre as populações ser mais eficiente do que o de pólen.

Embora baixa, a diversidade genética observada em *D. ferruginea* é importante para a sobrevivência e manutenção das populações naturais, porém são necessárias estratégias de conservação para evitar o aumento da diferenciação genética e conservar os índices de diversidade genética encontrada.

13 Anexos



RESOLUÇÃO Nº 13, DE 22 DE ABRIL DE 2014.

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

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

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

Aline Pedroso Lorenz Lemke,
Presidente.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone: 067 3345-7306

CEP 79070-900 * Campo Grande (MS) *

<http://www.ufms.br/posgraduacao> - e-mail: biovegetal.ufms@gmail.com