

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FERNANDA MARIA DE RUSSO GODOY

**Diversidade genética e sistema reprodutivo de populações naturais de
Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae) do Chaco úmido brasileiro**

Campo Grande – MS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FERNANDA MARIA DE RUSSO GODOY

**Diversidade genética e sistema reprodutivo de populações naturais de
Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae) do Chaco úmido brasileiro**

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Biologia Vegetal junto ao
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi – UFMS/CPAN
Coorientadora: Dr.^a Camila Martini Zanella – UFRGS/PPGBM

Campo Grande – MS

2016



*Dedico esta dissertação a minha família, em especial a minha
mãe Jânia e irmãos Miriam e Bruno, pelo incentivo e apoio em
todas as minhas escolhas e decisões.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, fonte de plena sabedoria, que, no decorrer do mestrado, me sustentou com esta palavra: “Tudo posso naquele que me fortalece” – (Filipenses 4,11-13).

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi, pela orientação, pelas críticas, sugestões e pela paciência. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade, nada disso seria possível.

À minha coorientadora Dr.^a Camila Martini Zanella pela orientação e disponibilidade, e principalmente por me auxiliar com as técnicas e análises de diversidade genética.

Ao Dr. Maurício Lenzi pela amizade e ajuda durante as realizações das coletas, aliados à prontidão e aos ensinamentos que me proporcionou neste período em que trabalhamos juntos e que foram primordiais para a concretização de mais esta etapa.

À Kelly Rondon, Thianny Viana, Renata Ruas, Bruno Henrique e Bruna Coutinho, pela amizade e companheirismo durante o mestrado.

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

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

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

À FUNDECT e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas de turma, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pelas palavras de apoio e encorajamento.

Agradeço à minha mãe Tânia que, com tantos encorajamentos, com tanta garra e sacrifícios me incentivaram a sempre ir adiante e prosseguir.

Aos meus irmãos Miriam e Bruno que também muito me apoiaram e incentivaram.

À todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização desse trabalho.

O meu muito obrigada!!!

*“Aquele que ama a correção ama a ciência, mas o
que detesta a reprimenda é um insensato”.*

Provérbios 12, 1.

Resumo

As bromélias são plantas típicas do Neotrópico, com distribuição geográfica desde os Estados Unidos da América (limite norte), até o norte da Patagônia, na Argentina (limite sul). *Bromelia hieronymi* Mez é uma bromélia estolonífera e fibrosa, que ocorre desde o Paraguai, Bolívia e nordeste da Argentina, em campos de vegetação xerófitica do Chaco semiárido, e em áreas de solo arenoso com pouca drenagem na região do Chaco úmido brasileiro, em Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul, local onde foi desenvolvido este estudo. As características ambientais desta região impõem às plantas severas condições de suprimento de água devido à pequena profundidade do substrato que, por sua vez, condiciona temperaturas elevadas e rápida evaporação. Neste trabalho nós tivemos como objetivo geral realizar um estudo sobre a diversidade genética, o fluxo gênico e o sistema reprodutivo de *B. hieronymi*. Para isso, foi amostrado e estudado um total de 109 indivíduos de duas populações naturais, distantes 30 km uma da outra. Para descrever a diversidade genética nós utilizamos marcadores de microssatélites nucleares e plastidiais descritos para outras espécies de Bromeliaceae, sendo cinco locos de microssatélites nuclear, e dois locos de microssatélites plastidial. Para o estudo do sistema reprodutivo foi avaliada a fertilidade natural e caracterizado o sistema de reprodução (sexuado e assexuado) preferencial da espécie, através de observações e de experimentos de polinização. Os resultados de diversidade genética revelaram índices de heterozigosidade semelhantes aos encontrados para outras espécies de bromélias. Estes altos índices de diversidade genética foram observados nas duas populações de *B. hieronymi*, tanto com marcadores de microssatélite nuclear ($H_O = 0,585$ e $H_O = 0,423$) como, também, plastidial ($H_E = 0,833$ e $H_E = 0,781$; e nove haplótipos). As populações de *B. hieronymi* apresentaram uma estruturação moderada ($F_{ST} = 0,075$), com um número de migrantes de 1,519 indivíduos por geração, com maior proporção da variação genética devido a diferenças dentro das populações (92,47%), e a menor entre populações (7,52%), demonstrando um moderado fluxo gênico entre as duas populações. A análise bayesiana revelou a presença de dois grupos genéticos ($K = 2$). As populações apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) de 0,152.

A taxa de fluxo de pólen em relação ao fluxo de semente mostrou um fluxo gênico mais eficiente via sementes, apresentando um valor de -0,52. Os resultados de fertilidade natural mostraram que *B. hieronymi* possui um alto investimento na formação de flores (44 ± 16) e frutos (55 ± 9), mas moderada formação de sementes (11 ± 4). *Bromelia hieronymi* é alogâmica, auto-incompatível e partenocárpica. A espécie forma sementes férteis apenas por meio da xenogamia, necessitando obrigatoriamente de agentes externos para obter sucesso nos processos de polinização. A partenocarpia foi observada em taxas entre 13,5% e 100%, o que pode estar relacionado a estratégias de dispersão e a proteção contra predação das sementes. O sistema de cruzamento alógamo pode estar contribuindo, em longo prazo, para o fluxo gênico via sementes, observado entre as duas populações de *B. hieronymi*. A espécie é clonal e pode emitir por planta de um a três estolões aéreos ao mesmo tempo, que são responsáveis pela estratégia de crescimento e de ocupação do ambiente pela espécie. A combinação dos sistemas assexuado e sexuado poderia estar contribuindo, a curto e longo prazo, respectivamente, com os altos índices de diversidade genética observados. A alta diversidade genética observada em *B. hieronymi* é importante para a sobrevivência e manutenção das populações naturais da espécie em longo prazo, porém são necessárias estratégias de conservação para evitar o aumento da diferenciação genética e conservar os altos índices de diversidade genética encontrados.

Palavras-chave: Genética de populações, microsatélites, fluxo gênico, auto-incompatibilidade e partenocarpia.

Abstract

Bromeliads are typical plants from Neotropics, with geographic distribution from the United States of America (northern boundary) to the north of Patagonia, Argentina (southern boundary). *Bromelia hieronymi* Mez is a stolonifera and fibrous bromeliad, which occurs from Paraguay, Bolivia and northern Argentina, in xerophytic vegetation fields of semi-arid Chaco, and in sandy soil areas with poor drainage in the Brazilian humid Chaco region in Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul State, where this study was developed. The environmental characteristics of this region impose to plants severe conditions of water supply due to the narrow depth of the substrate, which in turn, determines high temperatures and rapid water evaporation. In this study we analyzed the genetic diversity, gene flow and the reproductive system of *B. hieronymi*. To this, we sampled and analyzed in total 109 individuals from two natural populations of *B. hieronymi*, which are 30 km distant from each other. To describe the genetic diversity we use nuclear and plastid microsatellite markers described for other species of bromeliads, five loci of nuclear microsatellite and two of plastid microsatellite. To study the reproductive system, we evaluated and characterized natural fertility and the preferred reproductive system (sexual and asexual) of the species by observations and pollination experiments. The results of genetic diversity revealed levels of heterozygosities similar to those found in other species of bromeliads. These high levels of genetic diversity were observed in both populations of *B. hieronymi* in nuclear microsatellite markers ($H_O = 0.585$ and $H_O = 0.423$), as well as in plastid microsatellites ($H_E = 0.833$ and $H_E = 0.781$; nine haplotypes). The populations of *B. hieronymi* showed a moderate genetic structure ($F_{ST} = 0.075$), with a number of migrants per generation of 1.519, with a higher proportion of genetic variation due to differences within populations (92.47%), and lower among populations (7.52%), representing a moderate gene flow between the two populations. Bayesian analysis revealed the presence of two genetic groups ($K = 2$). Populations showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, with the inbreeding coefficient (F_{IS}) of 0.152. The relationship between pollen flow and seed flow rates showed that gene flow *via* seeds were more efficient, having a value of -0.52. The natural fertility results showed that *B.*

hieronymi has a high investment in flower (44 ± 16) and fruit (55 ± 9) production, but moderate production of seeds (11 ± 4). *Bromelia hieronymi* is allogamous, self-incompatible and partenocarpic. The species yielded fertile seeds only through outcrossing, necessarily requiring external agents to achieve success in the processes of pollination. The parthenocarpy was observed at rates between 13.5% and 100%, which may be related to dispersal strategies and to the protection of seeds against predation. The outcrossing mating system may contribute to long-term gene flow via seeds, observed between the two populations of *B. hieronymi*. The species is clonal and may emit one to three air stolons by each individual at the same time, growth strategy and occupation of the species environment is by production of long air stolons. The combination of asexual (short-term) and sexual (long-term) systems could be contributing to the high levels of genetic diversity observed. The high genetic diversity observed in *B. hieronymi* is important for the survival and maintenance of natural populations of the species in the long term. However, conservation strategies are necessary to avoid the increase of genetic differentiation and to maintain the high levels of genetic diversity found.

Keywords: Gene flow, microsatellites, parthenocarpy, population genetics, and self-incompatibility.

Sumário

1. Introdução geral	11
1.1. Diversidade e estrutura genética em populações naturais.....	11
1.2. Sistema reprodutivo	13
1.3. Bromeliaceae.....	14
1.4. Chaco úmido brasileiro	17
2. Objetivos	18
2.1. Objetivos gerais	18
2.2. Objetivos específicos	19
3. Referências Bibliográficas	19
4. Artigo	28
5. Considerações finais	69
6. Anexos	71

1. Introdução geral

1.1. Diversidade e estrutura genética em populações naturais

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

O advento dos marcadores moleculares de DNA, principalmente aqueles baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), oportunizou a caracterização genética de diferentes espécies em fina escala e sem a influência do ambiente (Reif et al. 2004). Além disso, análises utilizando marcadores moleculares 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 & Smouse 2002, He et al. 2004).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites ou SSR (“simple sequence repeats”) são marcadores codominantes, normalmente isolados de regiões não codificantes e espécie-específicos. Deste modo, estes marcadores podem ser utilizados para ajudar a resolver problemas que variam desde a taxonomia, questões relacionadas à paternidade, à estrutura genética de populações, comparação entre espécies, sistema de cruzamento, especialização ecológica e capacidade de colonização de populações (Parker et al. 1998, Boneh et al. 2003).

Como os locos de microssatélites são espécie-específicos, é necessário isolá-los para cada espécie. Porém, a presença de regiões flanqueadoras conservadas permite a amplificação desses locos em espécies próximas (Barbará et al. 2007a). O alto grau de polimorfismo

observado na espécie para a qual os locos foram descritos pode ocasionalmente não ser observado em espécies relacionadas, especialmente quando aumenta a distância evolutiva entre as mesmas (Rubinsztein et al. 1995). 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. 2007b, 2009, Palma-Silva et al. 2007, Paggi et al. 2008, Wöhrmann & Weising 2011, Wöhrmann et al. 2012, Zanella et al. 2012a, Goetze et al. 2013, Neri et al. 2015).

Os trabalhos publicados sobre a diversidade genética de populações da família Bromeliaceae ainda são poucos em comparação ao número de espécies conhecidas, pois dos 58 gêneros e aproximadamente 3.350 espécies conhecidas (Luther 2012), apenas 20 espécies de dez gêneros foram estudadas: *Aechmea* Ruiz & Pav., *Alcantarea* (E.Morren ex Mez) Harms., *Ananas* Mill., *Bromelia* L., *Dyckia* Schult. & Schult. f., *Encholirium* Mart. ex Schult.f., *Pitcairnia* L'Hér., *Puya* Molina, *Tillandsia* L. e *Vriesea* Lindl. (revisado por Zanella et al. 2012b). Marcadores codominantes foram os mais utilizados, com dez trabalhos utilizando microssatélites em treze espécies (Barbará et al. 2007a, 2009, Palma-Silva et al. 2009, 2011, Boisselier-Dubayle et al. 2010, Zanella et al. 2011, Carlier et al. 2012, Lavor et al. 2014, Goetze et al. 2015, Hmeljevski et al. 2015) e sete com aloenzimas (Soltis et al. 1987, Murawski & Hamrick 1990, Izquierdo & Piñero 2000, Sarthou et al. 2003, Alves et al. 2004, González-Astorga et al. 2004, Hmeljevski et al. 2011). Há apenas um estudo de diversidade genética com o gênero *Bromelia*, com a espécie *B. antiacantha* Bertol. (Zanella et al. 2011), a qual é uma espécie de ampla distribuição geográfica, ocorrendo em restingas e vegetação secundária da Mata Atlântica. Os resultados indicaram um alto e significativo coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0,431$), e altos níveis de diferenciação genética entre as populações de *B. antiacantha* ($F_{ST} = 0,224$), o que torna extremamente importante a conservação de suas populações.

1.2. Sistema reprodutivo

A polinização das flores aliada à formação e dispersão dos diásporos (frutos e sementes) são processos chave no sucesso reprodutivo de muitas espécies de plantas (Richards 1997). A produção de sementes é essencial para se determinar a sobrevivência das espécies em seu hábitat, e o estudo desse processo é fundamental para o melhor entendimento de uma comunidade vegetal (Kress 1983, Bertin 1989).

Em plantas com flores, encontra-se grande flexibilidade nos processos reprodutivos, variando desde a alogamia (polinização cruzada), autogamia (autocompatibilidade), até a apomixia (produção de sementes sem fecundação), com muitas espécies apresentando diferentes combinações de um ou mais sistemas de polinização (sistemas mistos) (Kress 1983, Richards 1997). As espécies mistas, como são chamadas, apresentam taxas de cruzamento que variam de 5 até 95%, dependendo das condições ambientais e da frequência de polinizadores (Karasawa 2009). O sucesso de sistemas mistos sobre restrições ambientais tem sido relatado para espécies da família Bromeliaceae, onde tais sistemas demonstram que a capacidade de autofertilização aumenta a possibilidade do sucesso reprodutivo destas espécies, como observado em *Aechmea lindenii* var. *lindenii* Backer (Lenzi et al. 2006), *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Vosgueritchian & Buzato 2006), *D. ibiramensis* Reitz (Hmeljevski 2007), *D. brevefolia* Baker (Rogalski et al. 2009) e *Vriesea gigantea* Gaudich (Paggi et al. 2015).

O modo de reprodução de uma espécie está diretamente relacionado com a composição e estrutura genética de suas populações (Richards 1997, Luna et al. 2005). A compreensão deste aspecto, desconhecido para a maioria das bromélias, é fundamental para entender como as populações estão estruturadas, podendo-se emitir subsídios para a sua conservação (Hamrick & Lovelless 1986, Paggi et al. 2015). Desta maneira, os estudos sobre estruturação genética evidenciam como o sucesso reprodutivo das plantas e de sua descendência são fundamentais

no estabelecimento de estratégias de conservação, uma vez que apontam o potencial adaptativo destas populações (Richards 1997).

A combinação dos sistemas de reprodução sexuada (sementes) e assexuado (propagação clonal), comum na maioria das espécies de bromélias (Benzing 2000), é considerado vantajoso em diferentes situações, em especial na ocupação e permanência de novos ambientes (Karasawa 2009, Liu et al. 2010). Desta forma, avaliar e relacionar as estratégias reprodutivas das bromélias é fundamental para a compreensão da dinâmica de reprodução, perpetuação e manutenção de suas populações tanto a curto quanto a longo prazo.

1.3. Bromeliaceae

A família Bromeliaceae Juss. é representada por ervas perenes com ampla variedade de formas, cores e tamanhos, ocupando os mais diversos tipos de habitats sendo reconhecidas pela habilidade de florescer em ambientes áridos e com deficiência nutricional (Benzing 2000), podendo ser terrestres, rupículas, epífitas ou reófitas (Reitz 1983). As bromélias são plantas típicas do Novo Mundo, com distribuição geográfica que vai desde os estados da Virgínia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos (limite norte), e no norte da Patagônia, na Argentina (limite sul). A única exceção é *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr localizada no oeste da África, na região da Guiné (Porembski & Barthlott 1999), o que parece ter sido um evento de recente dispersão a longa distância (Givnish et al. 2004).

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 cerca de 100 milhões de anos atrás (Ma) durante o Período Cretáceo e as subfamílias existentes atualmente começaram a divergir apenas há cerca de 19 Ma. Estes autores também sugeriram que há 15,4 Ma as bromélias chegaram à regiões da América tropical e subtropical. São considerados três centros de

diversidade para a família: do norte dos Andes até o México e as Antilhas, o Planalto das Guianas e o leste do Brasil (Smith & Downs 1974). Bromeliaceae é uma das famílias de maior riqueza e diversidade da Mata Atlântica (Martinelli et al. 2008), apresentando mais de 3.350 espécies, que sofreram uma extensa radiação adaptativa (Luther 2012).

Bromeliaceae era, tradicionalmente, dividida em três subfamílias: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Smith & Downs 1974). Porém, um estudo recente 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, Bromelioideae (Givnish et al. 2011).

O Brasil é um dos centros de diversidade da família Bromeliaceae, onde pode-se encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas, representando um contingente significativo de espécies e tornando o país o mais importante centro de diversidade desse grupo (Leme & Marigo 1993). Bromeliaceae contém espécies que são economicamente importantes, como o *Ananas comosus* (L.) Merr. (abacaxi), a quarta fruta tropical mais importante para a produção comercial, atrás da melancia, banana e manga (Chwee & Ahmad 2008), assim como muitas outras espécies valiosas localmente como fonte de fibras, como por exemplo, *Bromelia hieronymi* Mez, *B. serra* Griseb. e *B. urbaniana* (Mez) L.B. Sm., usadas pelos nativos do Chaco sul-americano (Suárez & Montani 2010). Ecologicamente, as bromélias são importantes fontes de frutos carnosos, fundamentais como alimento da fauna, néctar, água (fitotelmata) e abrigo para animais associados (mamíferos, anfíbios, pássaros e insetos; Benzing 2000).

Bromelia hieronymi (nome popular “caraguatá ou gravatá”) (Figura 1) é uma planta estolonífera e fibrosa, usada por nativos do Chaco sul-americano, as populações “Wichi”, na fabricação de artesanato (Smith & Downs 1979, Suárez & Arenas 2012). A espécie ocorre desde o Paraguai, Bolívia e nordeste da Argentina, em campos de vegetação xerofítica do Chaco

semiárido (Natalucci et al. 1985).

No Brasil, *B. hieronymi* é encontrada exclusivamente na região de Porto Murtinho, estado de Mato Grosso do Sul, sub-região do Pantanal, no Chaco úmido brasileiro (Figura 2) (Smith & Downs 1979, Natalucci et al. 1985, Abdon & Silva 2006). As características ambientais desta região impõem às plantas severas condições de suprimento de água devido à pequena profundidade do substrato, que por sua vez, condiciona temperaturas elevadas e rápida evaporação (Prado & Gibbs 1993).



Figura 1. *Bromelia hieronymi*. (A) planta com a inflorescência, (B) detalhe da flor na inflorescência, (C) planta emitindo o estolão aéreo.

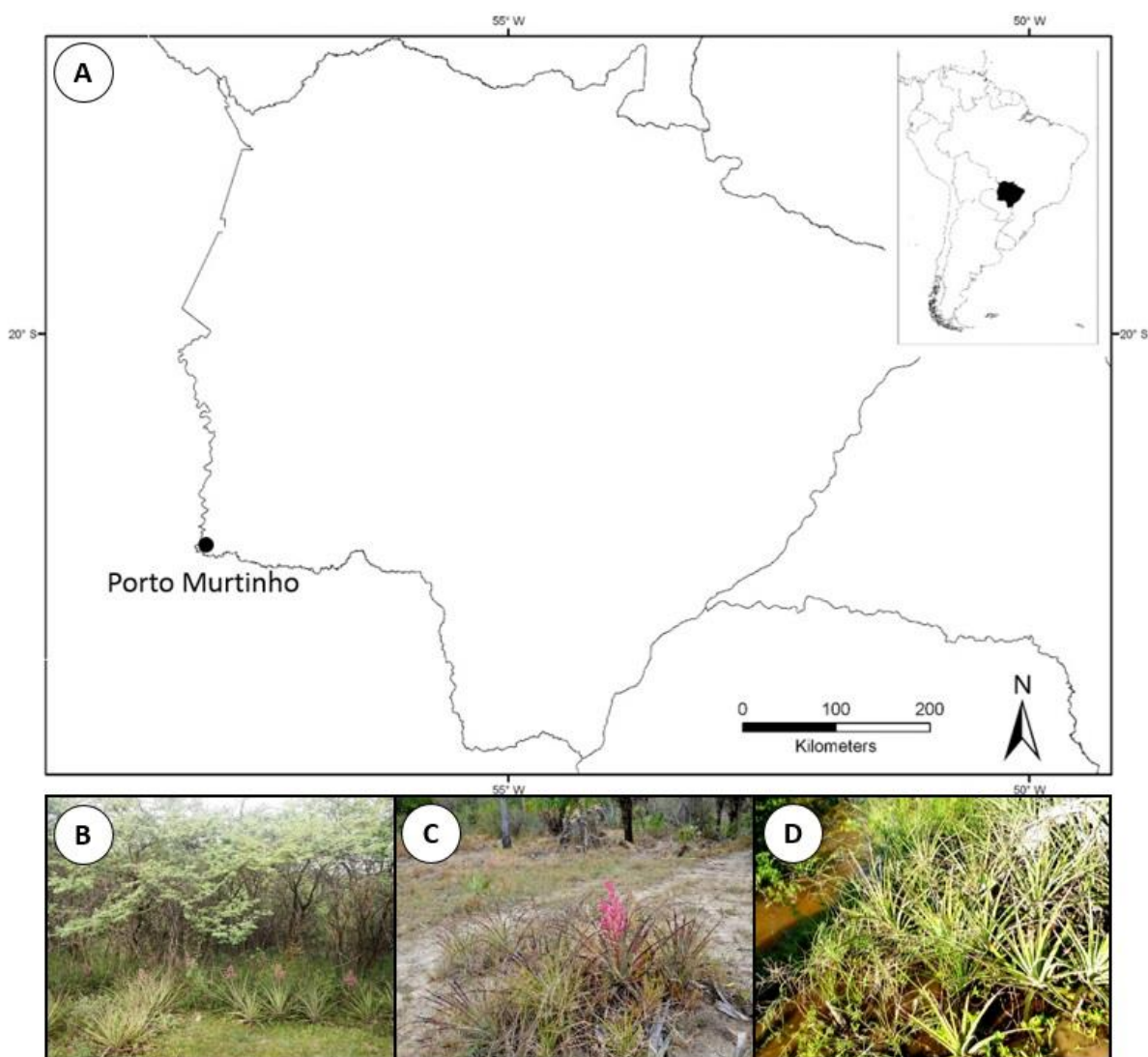


Figura 2. Mapa do município de Porto Murtinho, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Região do Chaco úmido brasileiro, em (A) local de coleta das populações de *Bromelia hieronymi*, (B) população natural da espécie no Chaco úmido brasileiro, (C) agrupamento da espécie durante o período de seca no Chaco úmido brasileiro, (D) e durante o período chuvoso.

1.4. Chaco úmido brasileiro

O Chaco está localizado em uma planície horizontal em aproximadamente todo o seu território, com algumas poucas elevações no seu limite oeste (Paraguai e Bolívia), devido à sua origem, que consiste de um acúmulo massivo de sedimentos Quaternários, resultado da erosão do recente soerguimento dos Andes (Prado 1993). O Chaco se divide em uma área central

extremamente seca (considerada o verdadeiro Chaco), e uma porção oriental que é mais úmida (Hueck 1972).

A região do Chaco inclui aproximadamente 800.000 km², e representa a maior área de matas secas da América do Sul abrangendo quatro países: Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil (Hueck 1972). 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 sudoeste (Prado & Gibbs 1993), separando a Floresta Amazônica da Mata Atlântica, formando uma barreira ao fluxo gênico para um grande número de espécies (p. ex. Cardoso et al. 2000, Lira et al. 2003, Salgueiro et al. 2004, Ledru et al. 2007, Turchetto-Zolet et al. 2012).

Na fisionomia chaquenha, geralmente associada com solos salinos, há uma grande diversidade de Leguminosae, Cactaceae e Bromeliaceae (Pennington et al. 2000, Pott & Pott 2003, Silva Jr et al. 2009). A formação chaquenha do Chaco úmido brasileiro é caracterizada como Savana Estépica Arbórea cuja fitofisionomia caracteriza-se pela ocorrência de espécies espinescentes, caducifólias, e micrófilas, comumente associada aos solos salinos (Silva et al. 2000).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Realizar estudo sobre a diversidade genética e o sistema reprodutivo de *B. hieronymi* (Bromeliaceae) em duas populações naturais que ocorrem no Chaco úmido brasileiro, Porto Murtinho-MS, buscando suprir a carência de conhecimento científico sobre os aspectos reprodutivos e genéticos da espécie, e subsidiar o estabelecimento de estratégias conservacionistas para a família Bromeliaceae.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar a diversidade genética e inferir sobre a estruturação genética de populações naturais de *B. hieronymi*;
- Determinar a contribuição relativa do fluxo de pólen em relação às sementes para o fluxo gênico da espécie;
- Avaliar a fertilidade natural da espécie;
- Caracterizar o sistema reprodutivo de *B. hieronymi*.

3. Referências Bibliográficas

- Abdon MM, Silva JVS. 2006. Fisionomias da vegetação nas sub-regiões do Pantanal Brasileiro. São José dos Campos: INPE, Campinas: Embrapa Informática Agropecuária.
- Alves GM, Rech-Filho A, 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 Genetic Resources* 2: 23-28.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C. 2007a. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981-1992.
- 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. 2007b. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*

16: 3759-3767.

Benzing DH. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 689 p.

Bertin RI, Barnes C, Guttman SI. 1989. Self-sterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). Botanical Gazette 150: 397-403.

Boisselier-Dubayle MC, Leblois R, Samadi S, Lambourdière J, Sarthou C. 2010. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geyskesii* on inselbergs in French Guiana – a test of the forest refuge hypothesis. Ecography 33: 175-184.

Boneh L, Kuperus P, Van Tenderem PH. 2003. Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculate* and *Guzmania monostachya*. Molecular Ecology Notes 3: 302-303.

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.

Carlier JD, Sousa NH, Santo TE, d'Eeckenbrugge GC, Leitão JM. 2012. A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) including SCAR, CAPS, SSR and EST-SSR markers. Molecular Breeding 29: 245–260.

Chwee CP, Ahmad I. 2008. An overview of the world production and marketing of tropical and subtropical fruits. Acta Horticultureae 787: 47-58.

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.

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny.

- American Journal of Botany 98(5): 872-895.
- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE, Sytsma KJ. 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south American-african disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhf* data. International Journal of Plant Science 165(4 Suppl.): S35-S54.
- Goetze M, Büttow MV, Zanella CM, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro FG, Sampaio JAT, Palma-Silva C, Cidade FW, Bered F. 2015. Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. Biochemical Systematics and Ecology 58: 204-210.
- Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C. 2013. Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. Biochemical Systematics and Ecology 48: 194-198.
- González-Astorga J, Cruz-Angón A, Flores-Palácios A, Vovides AP. 2004. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). Annals of Botany 94: 545-551.
- Hamrick JL, Loveless MD. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In *Frugivores and seed dispersal* (Estrada A, Fleming TH, eds.). Junk Publishers, New York, 17-59.
- 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.
- He T, Smouse PE. 2002. Paternity analysis in *Ophiopogon xylorrhizus* Wang et Tai (Liliaceae s.l.): selfing assures reproductive success. Journal of Evolutionary Biology 3: 487-494.

- Hmeljevski KV. 2007. Caracterização reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz, uma bromélia endêmica do Vale do Itajaí, SC. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Hmeljevski KV, Reis MS, Forzza RC. 2015. Patterns of Gene Flow in *Encholirium horridum* L.B.Sm., a Monocarpic Species of Bromeliaceae from Brazil. *Journal of Heredity* 106: 93–101.
- 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(3): 761-769.
- Hueck K. 1972. As regiões de matas do Chaco e áreas marginais. In *As florestas da América do Sul: Ecologia, composição e importância econômica* (Hueck K) Editora Polígono, Brasília, pp. 240-275.
- Izquierdo LY, Piñero D. 2000. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Australian Journal of Botany* 48: 645-650.
- Karasawa MMG. 2009. Diversidade reprodutiva das plantas. Sociedade Brasileira de Genética – SBG. Ribeirão Preto.
- Kress SW. 1983. The use of decoys, sound recordings, and gull control, for re-establishing a tern colony in Maine. *Colonial Waterbirds* 6: 185-196.
- Lavor P, van den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux LM. 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range. *American Journal of Botany* 101: 1167-1175.
- 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, Marigo LC. 1993. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual Ltda, Rio de Janeiro.
- Lenzi M, Matos JZ, Orth AI. 2006. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). Acta Botânica Brasílica 20(2): 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.
- Liu F, Liao YY, Li W, Chen JM, Wang QF, Motley TJ. 2010. The effect of pollination on resource allocation among sexual reproduction, clonal reproduction, and vegetative growth in *Sagittaria potamogetifolia* (Alismataceae). Ecological Research 25(3): 495-499.
- Luna R, Epperson BK, Oyama K. 2005. Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. Heredity 95: 298-305.
- Luther HE. 2012. An alphabetical list of bromeliad binomials. 13th edn. Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad Society.
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC. 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. Rodriguésia 59: 209-258.
- Murawski DA, Hamrick JL. 1990. Local genetic clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. American Journal of Botany 77(9): 1201-1208.
- Natalucci CL, Priolo NS, Buttazzoni MS, Caffini NO. 1985. Proteasas de Bromeliaceae. II. Separación, caracterización y fraccionamiento de una proteasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez". Acta Farmaceutica Bonaerense 4: 93-98.

- Neri J, Nazareno AG, Wendt T, Palma-Silva C. 2015. Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 58: 34-37.
- 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.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bodanese-Zanettini MH, Lexer C, Bered F. 2015. Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic forest bromeliad. *Flora* 211: 1–10.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes* 7: 654-657.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in a Neotropical forest species, *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). *Heredity* 103: 502-512.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C. 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* 20: 3185-3201.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Molecular Ecology* 79: 361-382.

- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27: 261-273.
- Porembski S, Barthlott W. 1999. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. *Harvard Papers in Botany* 4: 175-184.
- Pott A, Pott VJ. 2003. Espécies de fragmentos florestais em Mato Grosso do Sul. In Costa, R.B. (org.) Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região Centro-Oeste. UCDB, Campo Grande, p.26-52.
- Prado DE. 1993. What is the Gran Chaco vegetation in South America? I. A review. Contribution to the study of the flora and vegetation of the Chaco. *Candollea* 48: 145-172.
- Prado DE, Gibbs PE. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. *Annals of Missouri Botany Garden* 80: 902-927.
- Reif JC, Xia XC, Melchinger AE, Warburton ML, Hoisington DA, Beck D, Bohn M, Frisch M. 2004. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical and temperate germoplasm by SSR markers. *Crop Science* 44: 326-334.
- Reitz R. 1983. Bromeliáceas e a Malária-Bromélia Endêmica. In: Reitz, R. Flora ilustrada catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Fasc. BROM. 559p.
- Richards AJ. 1997. Plant breeding systems. London: Chapman & Hall. 529 p.
- Rogalski JM, Reis A, Dos Reis MS, Hmeljevski KV. 2009. Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), do Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 32: 691-702.
- 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.
- Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro M, Margis R. 2004. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Diversity and Distributions* 10: 201-210.
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J, Samadi S. 2003. Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcainia geyskii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes* 3: 221-223.
- Silva Jr NJ, Cintra CAD, Silva HLR, Costa MC, Souza CA, Pacheco Jr AA, Gonçalves FA. 2009. Herpetofauna, Ponte de Pedra Hydroelectric Power Plant, states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List* 5(3): 518-525.
- Silva MP, Mauro R, Mourao G, Coutinho M. 2000. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 143-152.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1-662.
- Smith LB, Downs RJ. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14: 1493-2141.
- Soltis DE, Gilmatin AJ, Rieseberg L, Gardner S. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 74(4): 531-537.
- Suárez ME, Arenas P. 2012. Dye plants and fungi among the Wichi people of the Gran Chaco. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 47(1-2): 275-283.

- Suárez ME, Montani RM. 2010. Vernacular knowledge of Bromeliaceae species among the Wichí people of the gran Chaco, Argentina. *Journal of Ethnobiology* 30(2): 265-288.
- 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.
- Vosgueritchian SBE, Buzato S. 2006. Sexual reproduction of *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) and plant-animal interaction. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 433-442.
- Wörhmann T, Weising K. 2011. *In silico* mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theoretical Applied Genetics* 123: 635-647.
- Wörhmann T, Pinangé DSB, Krapp F, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K. 2012. Development of 15 nuclear microsatellites markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources* 5(1): 81-84.
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Büttow MV, Cidade F, Bered F. 2011. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 98: 1-9.
- Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Katchuck-Santos E, Pinheiro FG, Paggi GM, Soares LES, Goetze M, Büttow MV, Bered F. 2012a. Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1020-1026.
- Zanella CM, Janke A, Paggi GM, Goetze M, Reis MS, Bered F. 2012b. Microsatellites in the Endangered Species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and Cross-Amplification in Other Bromeliads. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 15859-15866.

4. Artigo

**Biologia reprodutiva, diversidade genética e fluxo gênico em *Bromelia hieronymi* Mez
(Bromeliaceae): uma espécie autoincompatível do Chaco úmido brasileiro**

Artigo a ser submetido para *Botanical Journal of the Linnean Society*

**Biologia reprodutiva, diversidade genética e fluxo gênico em *Bromelia hieronymi* Mez
(Bromeliaceae): uma espécie auto-incompatível do Chaco úmido brasileiro**

FERNANDA MARIA DE RUSSO GODOY^{1,2}, MAURÍCIO LENZI², CAMILA MARTINI
ZANELLA^{3,4}, GECELE MATOS PAGGI^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, CEP 79070-900 Campo Grande, MS,
Brasil.

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

³Museu Nacional, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, Universidade Federal do Rio de Janeiro
- UFRJ, CEP 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁴Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul - UFRGS, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Título Resumido: Biologia reprodutiva e fluxo gênico em *B. hieronymi*

*E-mail para correspondência: gecele.paggi@ufms.br

RESUMO

Os estudos que envolvem o sucesso reprodutivo e a estruturação genética das plantas e de sua descendência são fundamentais no estabelecimento de estratégias de conservação, pois podem estimar o potencial adaptativo das populações. Esse estudo examinou o sistema reprodutivo e a diversidade genética em populações naturais de *Bromelia hieronymi* Mez, que ocorrem no Chaco úmido brasileiro. Os experimentos de polinização mostraram que *B. hieronymi* é alogâmica, auto-incompatível e partenocárpica. Para a diversidade genética nós utilizamos cinco marcadores de microssatélites nucleares e dois plastidiais. As duas populações de *B. hieronymi* apresentaram altos índices de diversidade genética, tanto para os marcadores nucleares ($H_O = 0,585$ e $H_O = 0,423$) como para os plastidiais ($H_E = 0,833$ e $H_E = 0,781$; e nove haplótipos), estruturação genética nuclear moderada ($F_{ST} = 0,075$) e moderado fluxo gênico entre as duas populações com um número de migrantes de 1,519 indivíduos por geração. O fluxo gênico via sementes foi mais eficiente que o fluxo gênico via pólen. O sistema de cruzamento alógamo pode possuir uma forte relação com os índices de fluxo gênico apresentado entre as duas populações de *B. hieronymi*. A alogamia associada à reprodução assexuada via estolões aéreos pode, também, ser responsável pelos altos índices de diversidade genética encontrados para a espécie, o que também pode ser devido à manutenção dos genótipos via clonagem.

Palavras-chave: Bromeliaceae – genética de populações – microssatélites – partenocarpia – sistema reprodutivo.

ABSTRACT

Reproductive biology, genetic diversity and gene flow in *Bromelia hieronymi* Mez

(Bromeliaceae): a self-incompatible species from Brazilian humid Chaco. Studies

involving the reproductive success and genetic structure of plants and their offspring are fundamental to the establishment of conservation strategies, since they may estimate the adaptive potential of populations. This study examined the reproductive system and genetic diversity in natural populations of *Bromelia hieronymi*, which occurs in the Brazilian humid Chaco. Pollination experiments showed that *B. hieronymi* is allogamous, self-incompatible and partenocarpic. For the genetic diversity estimates, we used five markers of nuclear microsatellites and two of plastid microsatellites. The two populations of *B. hieronymi* showed high genetic diversity, considering nuclear ($H_O = 0.585$ and $H_O = 0.423$) and plastid markers ($H_E = 0.833$ and $H_E = 0.781$; and nine haplotypes). The populations also showed moderate genetic structure ($F_{ST} = 0.075$) and moderate gene flow between them, with a number of migrants of 1,519 individuals per generation. Gene flow *via* seeds was more efficient than gene flow *via* pollen. The outcrossing mating system may have a strong relationship with the gene flow rates observed between the two populations. Outcrossing associated with asexual reproduction *via* air stolons may also be responsible for the high levels of genetic diversity found for the species, which can be also responsible of the maintenance of genotypes *via* cloning.

Keywords: Bromeliaceae –microsatellites – parthenocarpy – population genetics – reproductive system.

INTRODUÇÃO

Em plantas com flores, é observado grande flexibilidade nos processos reprodutivos, variando desde a alogamia (polinização cruzada), autogamia (autocompatibilidade), até a apomixia (produção de sementes sem fecundação), com muitas espécies apresentando diferentes combinações de um ou mais sistemas de polinização (sistemas mistos) (Kress, 1983; Richards, 1997). O sucesso de sistemas mistos sobre restrições ambientais tem sido relatado para algumas espécies de bromélias, onde tais sistemas demonstram que a capacidade de autofertilização aumenta a possibilidade do sucesso reprodutivo destas espécies, como em *Aechmea lindenii* var. *lindenii* Backer (Lenzi *et al.*, 2006), *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Vosgueritchian & Buzato, 2006), *D. ibiramensis* Reitz (Hmeljevski, 2007), *D. brevefolia* Baker (Rogalski *et al.*, 2009) e *Vriesea gigantea* Gaudich (Paggi *et al.*, 2015).

Como resultado dos processos reprodutivos por via sexuada pode ocorrer a partenocarpia, que é a produção de frutos sem sementes (Verdú & García-Fayos, 1998). Sua ocorrência pode estar relacionada a problemas fisiológicos das plantas e a ineficiência dos polinizadores (Zangerl *et al.*, 1991; Lenzi *et al.*, 2006), bem como a atração dos dispersores e defesa dos frutos férteis contra predadores (Werpachowski *et al.*, 2004; Lenzi *et al.*, 2006).

Os estudos de diversidade genética em populações naturais consistem em descrever os níveis de variação genética mantida dentro das populações, bem como a forma em que a variação genética é dividida entre elas (Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1987). A estrutura genética das populações reflete a interação entre diferentes processos, incluindo a sua história evolutiva (distribuição, fragmentação de habitat, isolamento da população), mutações, deriva genética, sistema de cruzamento, fluxo gênico e seleção (Sales *et al.*, 2001). Os marcadores moleculares têm sido frequentemente utilizados para esses estudos, fornecendo 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 & Smouse, 2002; He *et al.*, 2004).

O fluxo gênico é importante por suas implicações sobre a estrutura genética das populações, podendo ocorrer, no caso das plantas, por meio da dispersão do pólen e da semente (Martins, 1987). Assim como o fluxo gênico, o modo de reprodução de uma espécie também está diretamente relacionado com a composição e estrutura genética de suas populações (Richards, 1997). A compreensão destes aspectos é fundamental para entender como as populações estão estruturadas, o que contribui para a emissão de pareceres relacionados à sua conservação (Hamrick & Lovelless, 1986; Paggi *et al.*, 2015). A combinação dos sistemas de reprodução sexuada (sementes) e assexuado (propagação clonal) é considerada vantajosa a curto e longo prazos, em diferentes situações, em especial na ocupação e permanência em novos ambientes (Karasawa, 2009; Liu *et al.*, 2010).

O gênero *Bromelia* é um dos mais diversos dentro da subfamília Bromelioideae e inclui 60 espécies (Luther, 2012), que se distribuem da região central do México até a Bacia do Prata, na Argentina. Dois centros de diversidade podem ser reconhecidos para o gênero, o primeiro na América Central, estendendo-se aos Andes; e o segundo no Escudo Brasileiro, principalmente no Domínio do Cerrado (Benzing, 2000).

Buscando suprir a carência de conhecimento científico sobre os aspectos reprodutivos e genéticos de uma espécie pertencente ao gênero *Bromelia*, o objetivo geral deste trabalho foi estimar a diversidade genética e o fluxo gênico, e caracterizar o sistema reprodutivo de *B. hieronymi* (Bromeliaceae), em duas populações naturais que ocorrem no Chaco úmido brasileiro. Nossos objetivos específicos foram: (a) Caracterizar o sistema reprodutivo de *B. hieronymi*; (b) avaliar a fertilidade natural da espécie; (c) estimar a diversidade genética e inferir sobre a estruturação genética de populações naturais de *B. hieronymi*; e (d) determinar a contribuição relativa do fluxo de pólen em relação às sementes para o fluxo gênico da

espécie. Os resultados encontrados poderão auxiliar na elaboração de estratégias de conservação para *B. hieronymi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

ESPÉCIE E ÁREA DE ESTUDO

Bromelia hieronymi Mez é uma planta estolonífera e fibrosa, usada por nativos do Chaco sul-americano, as populações “Wichi”, na fabricação de artesanato (Suárez & Arenas, 2012). A espécie ocorre no Paraguai, Bolívia e nordeste da Argentina, em campos de vegetação xerofítica do Chaco semiárido (Natalucci *et al.*, 1985). No Brasil, *B. hieronymi* é encontrada na região de Porto Murtinho, estado de Mato Grosso do Sul (MS), sub-região do Pantanal, no Chaco úmido brasileiro (Smith & Downs, 1979; Natalucci *et al.*, 1985; Abdon & Silva, 2006). As características ambientais desta região impõem às plantas severas condições de suprimento de água devido à pequena profundidade do substrato, que por sua vez, condiciona temperaturas elevadas e rápida evaporação (Prado & Gibbs, 1993).

As coletas foram realizadas nos meses de julho e novembro de 2014, em remanescente de vegetação chaquenha na Fazenda Retiro Conceição, e na Fazenda Tereré (21°42'04"S, 57°53'06"W e 21°24'724"S, 57°47'105"W, respectivamente) (Figura 1). Na fisionomia chaquenha, geralmente associada com solos salinos, há uma grande diversidade de Leguminosae, Cactaceae e Bromeliaceae (Pennington *et al.*, 2000; Pott & Pott, 2003; Silva Jr *et al.*, 2009). A formação chaquenha do Chaco úmido brasileiro é caracterizada como Savana Estépica Arbórea cuja fitofisionomia caracteriza-se pela ocorrência de espécies espinescentes, caducifólias e micrófilas, comumente associada aos solos salinos (Silva *et al.*, 2000).

SISTEMA REPRODUTIVO

Fertilidade Natural - Em novembro de 2014 foi avaliada a fertilidade natural de *B. hieronymi* através de quantificação da produção de flores, óvulos\flor, frutos e número,

presença ou ausência de sementes (partenocarpia). Os experimentos foram desenvolvidos em cinco escapos florais e cinco infrutescências de plantas distintas, coletadas na população da Fazenda Tereré. Foram calculadas, a partir dos resultados obtidos, a razão fruto\flor, partenocarpia\fruto e semente\óvulo.

Experimentos de polinização - O sistema reprodutivo sexual de *B. hieronymi* foi caracterizado por meio de testes de polinização manual, utilizando-se de 33 a 37 flores por teste, de plantas distintas (n= 30) distantes a pelo menos 10 m entre si e nas duas populações naturais estudadas: 1) Para a polinização natural as flores foram acompanhadas sob condições naturais de polinização, sem manipulação; 2) no tratamento de polinização cruzada manual, as flores foram emasculadas e os grãos de pólen provenientes de flores de plantas distintas depositado sobre os estigmas; 3) o tratamento de autopolinização espontânea foi desenvolvido em flores ensacadas no dia que antecedeu a antese; 4) para o tratamento de autopolinização manual foi seguido o mesmo método da polinização cruzada manual, porém, com grãos de pólen provenientes de flores da mesma planta; 5) para o tratamento de apomixia (agamospermia) as flores foram ensacadas na pré-antese e em seguida emasculadas.

Após 90 dias, os frutos gerados dos diversos testes de polinização foram avaliados e quando maduros o número de sementes foi contado. A formação de frutos partenocárpicos foi acompanhada e determinada nos frutos gerados dos diferentes experimentos de polinização. Dessa forma, foram estabelecidas para cada teste de polinização às proporções fruto/flor, semente/fruto e a sua relação com a formação de frutos partenocárpicos. A partir dos frutos formados foram quantificados o comprimento (mm), diâmetro (mm) e peso (g) dos frutos férteis. Os dados obtidos foram analisados através dos testes de Kruskal-Wallis (Siegel & Castellani Junior, 1988) e *t*-Student (Sokal & Rohlf, 1995), ambos ao nível de 5% de significância.

Reprodução assexuada - A reprodução assexuada (propagação clonal) via estolões foi registrada e avaliada em campo, por meio de observações e contagens do número de perfilhos emitidos por planta (n= 30) e de sua relação entre a fase vegetativa e sexuada.

AMOSTRAGEM POPULACIONAL E EXTRAÇÃO DE DNA

Foi coletado um total de 109 indivíduos, amostrados nas duas populações conhecidas de *B. hieronymi* encontradas no Chaco úmido, sendo 28 da Fazenda Retiro Conceição, e 81 da Fazenda Tereré. As populações estão distantes cerca de 30 km uma da outra. Uma folha jovem de cada indivíduo foi coletada, as quais foram armazenadas em sílica gel até o momento da extração de DNA.

Bromelia hieronymi tem reprodução clonal (Smith & Downs, 1979), de forma que as amostras dos indivíduos foram coletadas com no mínimo 10 m de distância entre si, para se evitar a amostragem de clones. O DNA genômico foi extraído a partir de folhas segundo o protocolo de extração descrito por Doyle & Doyle (1990). As extrações de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1%, corados com Syber Green (Invitrogen), em comparação com DNA de fago λ .

MARCADORES MOLECULARES E GENOTIPAGEM

Para a caracterização da diversidade genética das duas populações de *B. hieronymi*, foram usados cinco locos de microssatélite nucleares (nrSSR) descritos para outras espécies de bromélias. Os locos utilizados foram: Ac25 e Ac55 (*Aechmea caudata*, Bromelioideae - Goetze *et al.*, 2013); VgA04 e VgC01 (*Vriesea gigantea*, Tillandsioideae - Palma-Silva *et al.*, 2007); e PaD07 (*Pitcairnia albiflos*, Pitcairnioideae - Paggi *et al.*, 2008). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 10 μ L, contendo: 10 ng de DNA, 1X de tampão da enzima, 2,0 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP mix, 1 pmol de “primer forward”, 4 pmol de “primer reverse”, 0,4 pmol de “primer” M13 marcado com diferentes fluorescências (FAM, VIC ou NED), e 0,5 U de Taq DNA polimerase (GoTaq,

Promega). As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o programa de ciclos do tipo “touchdown” conforme descrito por Palma-Silva *et al.* (2007). Os fragmentos amplificados 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 feitos testes de amplificação heteróloga em *B. hieronymi* com 12 locos de microssatélites de cloroplasto (cpSSR) descritos para o gênero *Dyckia* (Krapp *et al.*, 2012), onde somente dois amplificaram e foram utilizados no presente estudo: DSSR-L04 e DSSR-N07. As análises utilizando cpSSRs foram feitas com 97 indivíduos, amostrados nas duas populações de *B. hieronymi* do Chaco úmido, sendo 16 indivíduos coletados na Fazenda Retiro Conceição, e 57 na Fazenda Tereré. Os PCRs foram realizados em um volume final 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”, 0,16 pmol de “primer” M13 também marcado com diferentes fluorescências (VIC ou NED) e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (GoTaq, Promega). As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foi utilizado o protocolo de amplificação descrito por Krapp *et al.* (2012). Os fragmentos amplificados foram genotipados em sequenciador automático pela empresa MacroGen Inc (Coréia do Sul), e comparados com padrão molecular LIZ 500 (Applied Biosystems) usando o programa GeneMarker versão Demo 1.97 (SoftGenetics).

ANÁLISE DOS DADOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA

nrSSR - Para as análises de diversidade genética foram estimados: o número de alelos por locos (A); o número de alelos privados (AP); a riqueza alélica (R_s); a heterozigosidade observada (H_o); a heterozigosidade esperada (H_e); o F_{IT} – coeficiente total de endogamia; o

F_{IS} – coeficiente de endocruzamento e o F_{ST} – índice de fixação. Todos estes parâmetros foram estimados por meio dos programas MSA 4.00 (Dieringer & Schlötterer, 2003) e FSTAT 1.2 (Goudet, 1995). Cada loco e as populações foram testadas 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 usando o software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Foram realizadas análises de variância molecular (AMOVA) para identificar os padrões de estruturação genética hierárquica no programa Arlequin 3.5. Também foi realizada uma análise Bayesiana para estimar o número de grupos genéticos (K) com o programa Structure 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000). A proporção de associação em cada agrupamento foi calculada sem considerar as localidades amostradas. A análise foi realizada sob o modelo de mistura, assumindo frequências alélicas independentes e utilizando um período de “burn-in” de 50.000, corridas de 300.000 comprimentos e 10 interações para cada K , que variou de um a seis, para confirmar a estabilização das estatísticas (Pritchard *et al.*, 2000). Para determinar o número de grupos genéticos utilizou-se o critério proposto por Evanno *et al.* (2005), utilizando o programa Structure Harvester v 0.6.93 (Earl & VonHold, 2012).

cpDNA - Os tamanhos dos fragmentos obtidos com a amplificação das regiões de cloroplasto definiram o haplótipo para cada indivíduo. Uma rede de haplótipos foi construída, utilizando o programa Network 4.5 (disponível em www.fluxus-engineering.com), por meio do método *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999). As populações foram caracterizadas quanto aos níveis de diversidade considerando-se: o número de haplótipos encontrados; a diversidade gênica (H_E) (Nei, 1978) e a riqueza alélica (El Mousadik & Petit, 1996), estimados através do programa Rarefac v. 3.5 (Petit *et al.*, 1998). A análise da variância

molecular (AMOVA) foi realizada no programa Arlequin 3.5, para avaliar a distribuição da variação genética intraespecífica.

FLUXO GÊNICO VIA DISPERSÃO DE PÓLEN E SEMENTE

Para estimar a contribuição relativa do pólen *versus* fluxo de semente para o fluxo gênico, foi aplicada a fórmula de Ennos (1994):

Fluxo de pólen/ fluxo por sementes = $[(1/F_{ST}(b) - 1) - 2 (1/F_{ST}(m) - 1)] / (1/F_{ST}(m) - 1)$, onde $F_{ST}(b)$ e $F_{ST}(m)$ são os níveis de diferenciação populacional calculados para marcadores herdados biparentalmente (nrDNA) e maternalmente (cpDNA) respectivamente. Esse cálculo foi baseado no pressuposto da herança maternal de cpDNA em *B. hieronymi* como é na maioria das angiospermas (Ennos *et al.*, 1999) e como foi observado em espécies do gênero *Fosterella* (Bromeliaceae) (Wagner *et al.*, 2015).

RESULTADOS

SISTEMA REPRODUTIVO

Fertilidade natural - Os resultados de fertilidade natural revelaram um alto investimento por parte de *B. hieronymi* na formação de flores (44 ± 16) e frutos (55 ± 9), porém a média de formação de sementes (11 ± 4) e a taxa de produção de frutos partenocárpicos (33%) podem ser consideradas moderadas (Tabela 1). A relação do número de sementes por fruto e do número de óvulos por flor foi da ordem de 11\55, de maneira que a taxa de produção efetiva de sementes foi de 20% (Tabela 1). A radícula do embrião iniciou a emergência após 20 dias do início do experimento de germinação das sementes e aos 60 dias a taxa de germinação foi de 72%.

Experimentos de polinização - Os resultados dos experimentos de polinização (Tabela 2) revelaram que *B. hieronymi* é alogâmica, auto-incompatível e não é apomítica. A espécie se utiliza da xenogamia para obter sucesso reprodutivo uma vez que apenas os testes de

polinização livre e polinização cruzada manual resultaram na formação de frutos férteis (com sementes) (Tabela 2). O teste de polinização livre apresentou uma maior taxa de produção de frutos (86%) em comparação com a polinização cruzada manual (46%), diferindo significativamente ($t = 4,02$; $P < 0,05$). Já com relação ao número de sementes por fruto, a espécie produziu no teste de polinização livre em média $33,2 \pm 22,7$ sementes e no teste de polinização cruzada manual, em média $29 \pm 17,6$ (Tabela 2), não diferindo estatisticamente entre si ($t = -0,76$; $P > 0,05$).

Bromelia hieronymi é partenocárpica, apresentando taxas que variam de 13,5 a 100% de formação de frutos sem sementes, presentes no experimento de fertilidade natural e em todos os testes de polinização (Tabela 2).

Embora tenha ocorrido diferenças estatísticas significativas entre o número de frutos formados e o comprimento dos frutos ($t = 5,73$; $p < 0,05$) para alguns testes, não houve diferenças significativas nos demais critérios morfológicos analisados, como diâmetro e peso (Tabela 2).

Reprodução assexuada - *Bromelia hieronymi* é heliófita, terrestre e ocorre sobre solo arenoso, podendo permanecer parcialmente submersa durante o período de alagamento do Pantanal (Figura 2). A espécie pode emitir de um a três estolões aéreos ao mesmo tempo por planta ($n = 30$), entre outubro e dezembro, período concomitante ao reprodutivo sexual. A estratégia de crescimento clonal e da ocupação do ambiente pela espécie é do tipo “guerrilha” (*guerilla*, produções de longos estolões que permitem maior espaçamento entre os perfilhos), conforme classificação proposta por Lovett Doust (1981).

DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA NUCLEAR

Os cinco locos de microssatélites foram polimórficos em *B. hieronymi*, com uma média de 8 alelos por loco e um total de 40 alelos, variando de 4 a 13 alelos por locos (Tabela 3). As heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) por loco variaram de 0,173 a 0,868

e, 0,382 a 0,832, respectivamente. Em média, H_O e H_E foram 0,504 e 0,600. O coeficiente total de endogamia (F_{IT}) variou de -0,003 a 0,665, com valor médio de 0,244, e o índice de fixação (F_{ST}) variou de 0,013 a 0,159, com valor médio de 0,070, representando uma moderada diferenciação genética entre as populações. Em média, o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) apresentou o valor de 0,152, e variou de -0,424 a 0,551. Os locos Ac25, Ac55, VgA04 e VgC01 mostraram desvios significativos do HWE ($P < 0,005$; Tabela 3).

As duas populações de *B. hieronymi* apresentaram altos índices de diversidade genética (Tabela 4). A população da Fazenda Tereré apresentou 10 alelos a mais que a população da Fazenda Retiro Conceição. A população da Fazenda Tereré também apresentou maior número de alelos privados (12 alelos) em relação à população da Fazenda Retiro Conceição (seis alelos). Os resultados obtidos também mostraram um alto valor de riqueza alélica nas duas populações de *B. hieronymi* (5,09 e 6,20). Os valores de heterozigosidade observada e esperada foram de 0,585 e 0,665 na população da Fazenda Retiro Conceição, e de 0,423 e 0,535 na população da Fazenda Tereré, respectivamente. O coeficiente de endocruzamento apresentou valores de 0,131 e 0,186 sendo significativo para ambas as populações (Tabela 4). O número de migrantes foi 1,519, demonstrando um moderado fluxo gênico entre as populações.

A análise bayesiana do STRCTURE identificou dois agrupamentos genéticos ($K = 2$; Figura 3) em que os indivíduos da população da Fazenda Retiro Conceição formaram um grupo genético, enquanto outro grupo genético foi formado pelos indivíduos da população da Fazenda Tereré (Figura 4), nota-se que os grupos genéticos se sobrepõem sutilmente, o que pode ser atribuído aos migrantes entre as populações.

A análise de variância molecular (AMOVA) das populações de *B. hieronymi* (Tabela 5) mostrou uma estruturação genética moderada ($F_{ST} = 0,075$), e que a maior proporção da

variação genética ocorre devido a diferenças dentro das populações (92,47%), e a menor entre populações (7,52%).

DIVERSIDADE GENÉTICA PLASTIDIAL

Nove haplótipos foram encontrados nas populações amostradas de *B. hieronymi*. A população da Fazenda Tereré foi mais diversa com oito haplótipos, enquanto a população da Fazenda Retiro Conceição apresentou seis haplótipos. As populações apresentaram níveis altos de diversidade gênica (H_E), 0,833 e 0,781. A riqueza alélica foi 4,598 na população da Fazenda Retiro Conceição e 4,093 na Fazenda Tereré (Tabela 4).

Dos nove haplótipos encontrados nas populações de *B. hieronymi*, cinco são compartilhados entre elas: H1, H3, H4, H7 e H9 (Tabela 6). Destes, dois são mais frequentes na população Fazenda Retiro Conceição (H4 e H9) e outros dois são mais frequentes na população da Fazenda Tereré (H3 e H7) (Figura 5; Tabela 6). Os haplótipos H2, H6 e H8 ocorrem somente na população da Fazenda Tereré, já o H5 ocorre somente na população da Fazenda Retiro Conceição. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a menor proporção da variação genética (10,91%) pode ser atribuída a variação entre populações, enquanto que a maior variação ocorre dentro das populações (89,09%), (Tabela 5).

FLUXO GÊNICO VIA DISPERSÃO DE PÓLEN E SEMENTE

Com base nos valores estimados do F_{ST} da análise de variância molecular entre as populações para marcadores de microssatélites nucleares (0,07) e plastidial (0,10) foi estimada a taxa de fluxo de pólen em relação ao fluxo de semente, a qual foi de -0,52, mostrando um fluxo gênico mais eficiente via sementes.

DISCUSSÃO

FERTILIDADE E SISTEMA REPRODUTIVO

A alta taxa de formação de frutos em relação ao número de flores (Tabela 1) foi uma característica marcante constatada na reprodução sexuada de *B. hieronymi*, devido em grande parte a partenocarpia existente. As taxas de produção de sementes não foram altas quando comparadas ao número de óvulos existentes nas flores. Porém, as sementes produzidas naturalmente, ou seja, em flores sem nenhuma manipulação, obtiveram uma alta taxa de germinação (72%). Uma menor produção de sementes pode estar relacionada ao tipo de polinizador, padrão forrageiro e até mesmo a ausência ou ineficiência dos polinizadores (Endress, 1994; Brunet & Holmquist, 2009), ou ainda a algum mecanismo de autoincompatibilidade reprodutiva intensificada pela presença de clones nos agrupamentos e do isolamento de indivíduos (Richards, 1997). Espécies autoincompatíveis são dependentes de polinizadores (Endress, 1994), and in bromeliads, self-incompatibility occurs broadly in the Tillandsioideae and Bromelioideae subfamilies (Canela & Sazima, 2003, 2005; Hietz *et al.*, 2006; Vosgueritchian & Buzato, 2006; Mantallana *et al.*, 2010; Kamke *et al.*, 2011; Paggi *et al.*, 2012).

Os frutos de *B. hieronymi* são carnosos e em forma de baga armada. As taxas de produção de frutos partenocárpicos, tanto no experimento de fertilidade natural quanto no teste de polinização controle (livre), foram as menores entre os experimentos, ou seja, naquelas que não sofreram ensacamento e manipulação artificial. Este fato reforça a ideia de que estas plantas não estariam com problemas nos processos naturais de polinização ou fertilização (Werpachowski *et al.*, 2004; Lenzi *et al.*, 2006). A ocorrência de partenocarpia indica uma possível estratégia de dispersão e, também, uma estratégia de prevenção à predação dos frutos (Werpachowski *et al.*, 2004; Lenzi *et al.*, 2006; Zangerl *et al.*, 1991).

As sementes de *B. hieronymi* tiveram sua dormência quebrada artificialmente com escarificação em ácido sulfúrico, fato semelhante ao relatado por Coelho *et al.*, (2011) para sementes de *B. balansae* que possuem dormência tegumentar. Frutos carnosos das bromélias possuem grande importância na reprodução sexual e manutenção da fauna dispersora (Benzing, 2000) que, por sua vez, é fundamental para a quebra da dormência de sementes e sua posterior germinação (Reitz, 1983; Benzing & Kaelyn, 1998).

Bromelia hieronymi apresenta propagação vegetativa via estolões lançados sobre a superfície do substrato, diferindo do descrito por Smith & Downs (1974) que classificaram os estolões como subterrâneos. A emissão dos estolões ocorre concomitantemente ao período reprodutivo sexual, evento comum em Bromeliaceae (Reitz, 1983; Benzing, 2000; Siqueira Filho & Machado, 2001; Canela & Sazima, 2005). A combinação da reprodução sexuada com a assexuada é considerada vantajosa, quando comparada à existência de apenas um modo de propagação, pois ambas as formas de reprodução são importantes sob condições adversas e competitivas (Richards, 1997; Benzing, 2000; Rogalski *et al.*, 2009). Somado a isso, a reprodução assexuada do tipo “*guerilla*” é caracterizada pela produção de longos estolões que permitem maior espaçamento entre os perfilhos (Lovett Doust, 1981), o que poderia diminuir a visitação dos polinizadores entre flores de uma mesma inflorescência e inflorescências próximas, aumentando assim a possibilidade de xenogamia e incremento no fluxo gênico. Moreover, the floral structure of bromeliads is generally specialized in a manner that prevents spontaneous self-fertilization and that facilitates animal-mediated outcrossing (Benzing, 2000).

DIVERSIDADE GENÉTICA E FLUXO GÊNICO

Os resultados de diversidade genética mostraram que *B. hieronymi* apresenta alta diversidade genética, sendo que as duas populações estudadas apresentaram índices de diversidade genética ($H_O = 0,585$ e $0,423$) maiores que os observados em estudos feitos com

outras espécies da família Bromeliaceae, como *Alcantarea geniculata* ($H_O = 0,357$; Barbará *et al.*, 2007), *A. imperialis* ($H_O = 0,362$; Barbará *et al.*, 2007), *B. antiacantha* ($H_O = 0,335$; Zanella *et al.*, 2011), e próximo ao observado em *Aechmea caudata* ($H_O = 0,467$; Goetze *et al.*, 2013). O baixo coeficiente de endocruzamento observado indicou um excesso de heterozigotos, o que pode ser devido a auto-incompatibilidade detectada na espécie, a qual geraria uma produção de sementes com alta variabilidade e, também, ao fato da planta ser clonal (Klimes *et al.*, 1997), em ambos os casos poderia haver um incremento, tanto a longo quanto a curto prazo, respectivamente, na manutenção dos genótipos.

Foi observada, entre as duas populações de *B. hieronymi*, uma moderada diferenciação genética ($F_{ST} = 0,075$), corroborando com os resultados obtidos na análise Bayesiana, onde foram observados dois grupos genéticos, com alto grau de mistura na população da Fazenda Tereré. Vários indivíduos migrantes foram observados pela análise Bayesiana, demonstrando ocorrer fluxo gênico entre as populações, o que também está de acordo com os valores moderados de estruturação genética e com o número observado de migrantes por geração. Segundo Fischer *et al.* (2000) espécies alógamas, ao contrário das autógamas, tendem a apresentar altos índices de variabilidade genética e baixa diferenciação genética entre as populações.

A maior variação molecular foi observada dentro das populações de *B. hieronymi*. Em estudo com populações de *Aechmea winkleri* também foi observada a ocorrência de alta porcentagem de variação molecular dentro das populações (96,64%), e apesar de as populações de *A. winkleri* não estarem bem estruturadas, houve a formação de dois grupos genéticos na análise bayesiana (Goetze *et al.*, 2015). *Aechmea winkleri* apresentou elevados níveis de fluxo gênico ($Nm = 1,19- 4,09$) entre as localidades, já nas populações de *B. hieronymi* o fluxo gênico foi moderado. Esta diferença pode estar relacionada aos diferentes

padrões de forrageio dos polinizadores, bem como no comportamento dos agentes de dispersão de frutos e sementes.

Bromelia hieronymi também apresentou altos índices de diversidade genética nas análises com cpDNA, com o número de haplótipos nas populações maiores do que os encontrados para *V. gigantea* (NH = 9), assim como os valores de diversidade gênica, que nas populações de *V. gigantea* foi moderado ($H_E = 0,486$), enquanto que nas populações de *B. hieronymi* a média foi de 0,807. Este resultado mostra que ambas as populações apresentam um alto grau de polimorfismo, cujos genótipos provavelmente estão sendo mantidos através da reprodução clonal (Klimes *et al.*, 1997; Vallejo-Marín & O'Brien, 2007).

Através da rede de haplótipos, pôde-se observar que a maior diversidade e frequência de haplótipos ocorrem na população da Fazenda Tereré, isso pode estar relacionado ao tamanho da população, já que esta população é maior do que a da Fazenda Retiro Conceição. Porém, não foram observadas barreiras ao fluxo gênico entre as populações, uma vez que na rede de haplótipos não foram observadas separações claras entre os haplótipos ou formações de grupos.

O fluxo de grãos de pólen em relação ao fluxo de sementes mostrou que o fluxo gênico via sementes é mais eficiente (-0,52). *Bromelia hieronymi* forma frutos carnosos em forma de baga (Smith & Downs, 1979), com indícios de que estes frutos possivelmente estão sendo consumidos por mamíferos e aves, os quais são os possíveis dispersores das sementes (observação pessoal). Existem muitos fatores que atuam na determinação dos padrões de dispersão das plantas e neste processo, os frugívoros são um elemento importante, contribuindo nos estágios sucessionais e na manutenção da heterogeneidade de diversos habitats (Domínguez -Domínguez *et al.*, 2006; Lenzi *et al.*, 2012). É notável que cerca de 70% dos frutos carnosos estão adaptados à dispersão por vertebrados no Pantanal (Donatti *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que as populações de *B. hieronymi* ainda conservam altos níveis de diversidade genética, e possuem moderado fluxo gênico. O fato de ser uma espécie auto-incompatível provavelmente contribui para a manutenção dessa diversidade. Já 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. O fluxo gênico via semente foi maior do que via pólen, mostrando um importante papel dos dispersores de sementes em manter a conectividade genética das populações, bem como a ação dos polinizadores que provavelmente também contribuem de forma significativa, uma vez que a espécie é alogâmica. A propagação vegetativa via estolões também pode ser responsável pela manutenção dos genótipos nas populações. *Bromelia hieronymi* tem sua ocorrência restrita ao bioma Chaco, ocorrendo em áreas de solo arenoso com pouca drenagem, que impõe condições ambientais severas a espécie, e apesar de ainda ter considerável diversidade genética, a fragmentação de seu habitat no Chaco úmido, devido a atividades de pecuária, queimadas, e do constante extrativismo nessa região, colocam em risco sua permanência no ambiente, já que suas populações não estão protegidas em unidades de conservação. Dessa forma, seria de grande importância para a manutenção da espécie, o monitoramento e a conservação das duas populações avaliadas, principalmente para possibilitar a manutenção do fluxo gênico entre elas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro através da Chamada Edital FUNDECT/CNPq N° 05/2013 – DCR, e ao CNPq pelo apoio financeiro através do Edital MCTI/CNPq/MEC/CAPES - Ação Transversal nº6/2011 – Casadinho/Procad, especialmente

à Dr.^a Ângela Lúcia Bagnatori Sartori. Os autores agradecem também a Bruno Henrique dos Santos Ferreira, Ana Carla de Almeida, Renata de Barros Ruas e Kelly Rondon pela ajuda no trabalho de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdon MM, Silva JVS. 2006. Fisionomias da vegetação nas sub-regiões do Pantanal Brasileiro. São José dos Campos: INPE, Campinas: Embrapa Informática Agropecuária.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C. 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Molecular Ecology* 16: 1981-1992.
- Benzing DH. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge: Cambridge University Press.
- Benzing DL, Kaelyn ES. 1998. Dispersão de sementes em bromélias de frutos carnosos: interpretações incorretas e orientação para estudos mais aprofundados. *Revista Bromélia* 5: 23-35.
- Brunet J, Holmquist KGA. 2009. The influence of distinct pollinators on female and male reproductive success in the rocky mountain columbine. *Molecular Ecology* 18: 3745-3758.
- Canela MBF, Sazima M. 2003. *Aechmea pectinata*: a hummingbird-dependent bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in south-eastern Brazil. *Annals of Botany* 92: 731-737.

- Canela MBF, Sazima M. 2005. The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in Southeastern Brazil: ornithophilous versus melittophilous features. *Plant Biology*, 7(4):1-6.
- Coelho MDFTB, Vieira SN, Chig LA, Santos LW, Albuquerque MCDFE. 2011. Superação da dormência em sementes de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). *Horticultura Brasileira* 29: 472-476.
- Cruden R.W. 1977. Pollen - ovule ratios - conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46
- 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.
- Dieringer D, Schlötterer C. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167-169.
- Domínguez-Domínguez, LE, Morales-Mávil JE, Alba-Landa J. 2006. Germinación de semillas de *Ficus insipida* (Moraceae) defecadas por tucanes (*Ramphastos sulfuratus*) y monos araña (*Atteles geoffroyi*). *International Journal of Tropical Biology* 54: 387-394.
- Donatti CI, Galetti M, Pizo MA, Guimarães PR, Jr Jordano P. 2007. Living in the land of ghosts: fruit traits and the importance of large mammals as seed dispersers in the Pantanal, Brazil. In: Dennis A, Green R, Schupp EW, Wescott DA, editors. *Frugivory and seed dispersal: theory and applications in a changing world*. Wallingford, UK. Commonwealth Agricultural Bureau International 104-123p.
- Doyle JJ, Doyle JL .1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Earl DA, von Holdt, BM. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.

- El Mousadik A, Petit RJ. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness. *Theoretical and Applied Genetics* 92(7): 832-839.
- Endress PK. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge. 311p.
- Ennos RA. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant-populations. *Heredity* 72: 250–259.
- Ennos RA, Sinclair WT, Hu X-S, Langdon. 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology, and evolution of plants populations. In: Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ (eds.) *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, London.
- 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. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Faegri K, van der Pijl L. 1979. The principles of pollination ecology. Oxford: Pergamon Press 3rd rev edn.
- 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). *American Journal of Botany* 87: 1128-1137.
- Goetze M, Büttow, MV, Zanella CM, Paggi GM, Bruxel M, Pinheiro FG, Sampaio JAT, Palma-Silva C, Cidade FW, Bered F. 2015. Genetic variation in *Aechmea winkleri*, a bromeliad from an inland Atlantic rainforest fragment in Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 58: 204-210.

Goetze M, Louzada RB, Wanderley MGL, Souza LM, Bered F, Palma-Silva C. 2013.

Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. *Biochemical Systematics and Ecology* 48: 194-198.

Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.

Hamrick JL. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: *Genetics and conservation* (C.M. Schone-Wald-Cox, S.H. Chambers, B. MacByde, L. Thomas, eds.). Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park 335-348p.

Hamrick JL, Loveless MD. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: *Frugivores and seed dispersal* (Estrada A, Fleming TH, eds.). Junk Publishers 17-59p.

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.

He T, Smouse PE. 2002. Paternity analysis in *Ophiopogon xylorrhizus* Wang et Tai (Liliaceae s.l.): selfing assures reproductive success. *Journal of Evolutionary Biology* 3: 487-494.

Hietz P, Winkler M, Cruz-Paredes L, Jiménez-Aguilar A. 2006. Breeding systems, fruit set, and flowering phenology of epiphytic bromeliads and orchids in a Mexican humid mountain forest. *Selbyana* 27:156-164.

Hmeljevski KV. 2007. Caracterização reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz, uma bromélia endêmica do Vale do Itajaí, SC. Dissertação de Mestrado na Universidade Federal de Santa Catarina.

- Kamke R, Schmid S, Zillikens A, Lopes BC, Steiner J. 2011. The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. *Flora* 206:749-756.
- Karasawa MMG. 2009. Diversidade reprodutiva das plantas. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética – SBG.
- Klimeš L, Klimesová J, Hendriks R., van Groenendael J. 1997. Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. - In: H. de Kroon, J. van Groenendael eds. The ecology and evolution of clonal plants. Backhuys Publishers 1 - 29.
- Krapp F, Wohrmann T, Pinangé DSB, Benko-Iseppon AM, Huettel B, Weising K. 2012. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. *American Journal of Botany* 12: 470-473.
- Kress SW. 1983. The use of decoys, sound recordings, and gull control, for re-establishing a tern colony in Maine. *Colonial Waterbirds* 6: 185-196.
- Lenzi M, Graipel ME, Matos JZ, Fraga AM, Orth AI. 2012. Dispersão zoocórica e hidrográfica marítima de *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw. (Cactaceae). *Revista Biotemas* 25: 47-53.
- Lenzi M, Matos JZ, Orth AI. 2006. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Botânica Brasílica* 20: 487-500.
- Liu F, Liao YY, Li W, Chen JM, Wang QF, Motley TJ. 2010. The effect of pollination on resource allocation among sexual reproduction, clonal reproduction, and vegetative growth in *Sagittaria potamogetifolia* (Alismataceae). *Ecological Research* 25: 495-499.
- Loveless MD, Hamrick JL. 1987. Distribucion de la variacion en especies de arboles tropicales. *Revista Biologia Tropicales* 35: 165- 75.
- Lovett Doust L. 1981. Intracloonal variation and competition in *Ranunculus repens*. *New Phytologist* 89: 495- 502.

- Luther HE. 2012. An alphabetical list of bromeliad binomials. 13th edn. Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad Society International.
- Matallana G, Godinho MAS, Guilherme FAG, Belisario M, Coser TS, Wendt T. 2010. Breeding systems of Bromeliaceae species: Evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Syst Evol.* 289:57–65.
- Martins PS. 1987. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação *in situ*. *IPEF* 35: 71-78.
- Natalucci CL, Priolo NS, Buttazzoni MS, Caffini NO. 1985. Proteasas de Bromeliaceae. II. Separación, caracterización y fraccionamiento de una proteasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 4: 93-98.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- 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: 980-982.
- Paggi GM, Silveira LCT, Zanella CM, Bruxel M, Bered F, Kal-tchuck-Santos E, Palma-Silva C. 2012. Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. *Plant Spec Biol* 1442-1984.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bodanese-Zanettini MH, Lexer C, Bered F. 2015. Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic forest bromeliad. *Flora* 211: 1–10.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and

- Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross amplification in other bromeliad species. Molecular Ecology Notes 7: 654-657.
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. Journal of Biogeography 27: 261-273.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conservation Biology 12: 844–855.
- Pott A, Pott VJ .2003. Espécies de fragmentos florestais em Mato Grosso do Sul. In: Costa, R.B. (org.) Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região Centro-Oeste. Campo Grande, UCDB 26-52.
- Prado DE, Gibbs PE. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America. Annals of Missouri Botany Garden 80: 902-927.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
- Reitz R. 1983. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. In: Reitz R Flora Ilustrada Catarinense (Fasc. Brom.) Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.
- Richards AJ. 1997. Plant breeding systems. London: Chapman & Hall.
- Rogalski JM, Reis A, Dos Reis MS, Hmeljevski, KV. 2009. Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), do Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina Brasil. São Paulo, Revista Brasileira de Botânica 32: 691-702.
- 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.
- Sampaio, M.C. & Perissé, L.E. 2002. The contrasting clonal architecture of two bromeliads from sandy coastal plains in Brazil. Flora 197: 443-451.

- Siegel S, Castellani Junior NJ. 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York, Cataloging in Publication Data.
- Silva Jr, NJ, Cintra CAD, Silva HLR, Costa MC, Souza CA, Pacheco Jr AA, Gonçalves FA. 2009. Herpetofauna, Ponte de Pedra Hydroelectric Power Plant, states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil. Check List 5: 518-525.
- Silva MP, Mauro R, Mourao G, Coutinho M. 2000. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. Revista Brasileira de Botânica 23: 143-152.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica 14: 1-662.
- Smith, LB, Downs RJ. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica 14: 1493-2141.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. New York, W.H. Freeman.
- Siqueira Filho JA, Machado IC. 2001. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. Acta Botanica Brasilica 15: 427-443.
- Suárez ME, Arenas P. 2012. Dye plants and fungi among the Wichi people of the Gran Chaco. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 47: 275-283.
- Vallejo-Marín M, O'Brien HE. 2007. Correlated evolution of self-incompatibility and clonal reproduction in *Solanum* (Solanaceae). The New Phytologist 173: 415-421.
- Verdú M, García-Fayos P. 1998. Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). Canadian Journal of Botany 76: 134-141.

- Vosgueritchian SBE, Buzato S. 2006. Sexual reproduction of *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) and pant-animal interaction. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 433-442.
- Wagner D, Eisenhauer N, Cesarz S. 2015. Plant species richness does not attenuate responses of soil microbial and nematode communities to a flood event. *Soil Biology and Biochemistry* 89: 135-149.
- Werpachowski JS, Varassin IG, Goldenberg R. 2004. Apomixia e partenocarpia em *Asteraceae* subtropicais. *Revista Brasileira de Botânica* 27: 607-613.
- Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Büttow MV, Cidade F, Bered F. 2011. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 98: 1-9.
- Zangerl AR, Berenbaum, MR, Nitao JK. 1991. Parthenocarpic fruits in wild parsnip: Decoy defense against a specialist herbivore. *Evolutionary Ecology* 5: 136-145.

Legendas das figuras

Figura 1. Município de Porto Murtinho, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Região do Chaco úmido brasileiro, local de coleta das populações de *Bromelia hieronymi*.

Figura 2. *Bromelia hieronymi*; (A) Agrupamento em solo arenoso, (B) planta parcialmente submersa na época da chuva e (C) emissão do estolão.

Figura 3. Estruturação das populações de *Bromelia hieronymi* usando a análise bayesiana de agrupamentos para o modelo populacional de $K = 2$, baseado em cinco microssatélites nucleares.

Figura 4. Magnitude de ΔK da análise de estruturação como uma função de K (média $\pm$ d.p. das dez interações), calculado de acordo com o método proposto por Evanno *et al.*, (2005), para os dados de microssatélites nucleares em *Bromelia hieronymi*. O valor modal da distribuição indica o verdadeiro K ou o maior nível de estruturação, neste caso foram identificados dois grupos genéticos.

Figura 5. Análise de *Median-joining* da relação entre haplótipos de cpDNA de 73 indivíduos de *Bromelia hieronymi* das populações da Fazenda Retiro Conceição e Fazenda Tereré, baseado em dois locos de microssatélites plastidiais. O tamanho de cada círculo é proporcional a frequência observada de cada haplótipo. Cada barra representa um passo mutacional.

Tabela 1. Número (N) de estruturas avaliadas, razão (R) entre o número de frutos formados pelo número de flores, taxas de sucesso de frutificação (%), média (X) e desvio padrão (SD) das características reprodutivas naturais de *Bromelia hieronymi* em Porto Murtinho, MS.

Características reprodutivas	N	R (%)	X ± SD
Flores por inflorescência	5	-	44 ± 16 (máx = 61, mín = 20)
Óvulos/flor	5	-	55 ± 9 (máx = 69, mín = 45)
Frutos férteis	138	-	41 ± 17 (máx = 53, mín = 17)
Frutos partenocárpicos	69	-	14 ± 9 (máx = 27, mín = 3)
Razão fruto/flor	-	207/219 (94,5%)	-
Razão partenocarpia/fruto	-	69/207 (33%)	-
Sementes por fruto	138	-	11 ± 4 (máx = 48, mín = 1)
Razão semente/óvulo	-	11/55 (20%)	-

Tabela 2. Testes de polinização, razão entre o número de frutos formados pelo número de flores por teste, taxas (%) de sucesso de frutificação, média (X) e desvio padrão (SD) da morfologia de frutos e do número de sementes, razão entre o número de frutos formados pelo número de frutos partenocárpicos por teste e taxa (%) de sucesso efetivo de frutificação de *Bromelia hieronymi* em Porto Murtinho, MS. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste “*t*” ($P < 0,05$).

Tratamentos	Razão			Razão		
	Fruto/Flor	Comprimento/fruto	Diâmetro/Fruto	Peso/Fruto	Sementes/Fruto	Partenocarpia/Frutos
	(%)	X $\pm$ SD (mm)	X $\pm$ SD (mm)	X $\pm$ SD (g)	X $\pm$ SD	(%)
Polinização livre	32/37 (86) a	50,5 $\pm$ 3,7 a	16,5 $\pm$ 2,5 a	6 $\pm$ 2 a	29 $\pm$ 17,6 a	5/37 (13,5%)
Polinização cruzada						
manual	17/37 (46) b	43,7 $\pm$ 4,4 b	19,2 $\pm$ 4,2 a	6,6 $\pm$ 2,8 a	33,2 $\pm$ 22,7 a	20/37 (54%)
Autopolinização manual	0/34	-	-	-	-	34/34 (100%)
Autopolinização						
espontânea	0/34	-	-	-	-	29/34 (85%)
Apomixia	0/33	-	-	-	-	33/33 (100%)

Tabela 3. Índices de diversidade genética e estimativas da estatística F de Wright de cinco locos de microsatélites em duas populações naturais de *Bromelia hieronymi*.

Locos	A	H_O	H_E	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
Ac25	5	0,258	0,436	0,369	0,159	0,291*
Ac55	13	0,445	0,832	0,665	0,123	0,447*
PaD07	7	0,775	0,552	-0,392	0,013	-0,424
VgA04	11	0,868	0,798	-0,003	0,027	-0,105*
VgC01	4	0,173	0,382	0,582	0,030	0,551*
Total/Média	40	0,504	0,600	0,244	0,070	0,152

Abreviações: A= número de alelos por loco; H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; F_{IT} = coeficiente total de endogamia; F_{ST} = índice de fixação; F_{IS} = coeficiente de endocruzamento.

Tabela 4. Diversidade genética nuclear e plastidial nas populações de *B. hieronymi* incluindo o número de alelos (A), alelos privados (AP), riqueza alélica (R_S), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), número de haplótipos (NH), diversidade gênica (H_E) e riqueza alélica.

Populações	nrDNA						cpDNA		
	A	AP	R_S	H_O	H_E	F_{IS}	NH	H_E (desvio padrão)	Riqueza Alélica
Fazenda Retiro Conceição	29	6	5,09	0,585	0,665	0,131*	6	0,833 (0,056)	4,598
Fazenda Tereré	39	12	6,20	0,423	0,535	0,186*	8	0,781(0,030)	4,093

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

Tabela 5. Análise da variância molecular (AMOVA) para *Bromelia hieronymi*, baseado em dados de microssatélites nucleares e plastidiais.

Fonte de Variação	g.l.	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação	F_{ST}	Valor de P
<i>Microssatélites nucleares</i>					
Entre populações	1	0,11448	7,53	0,075	$P<0,001$
Dentro das populações	216	1,40611	92,47		$P<0,001$
<i>Microssatélites de cloroplasto</i>					
Entre populações	1	0,07894	10,91	0,109	$P<0,001$
Dentro das populações	71	0,64460	89,09		$P<0,001$

Tabela 6. Frequência de haplótipos de cpDNA em duas populações analisadas de *Bromelia hieronymi*. (N) = número de indivíduos amostrados por população.

ID	Haplótipos								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
FRC (16)	2		1	4	3		1		5
FT (57)	2	20	11	1		3	14	5	1

Figura 1.

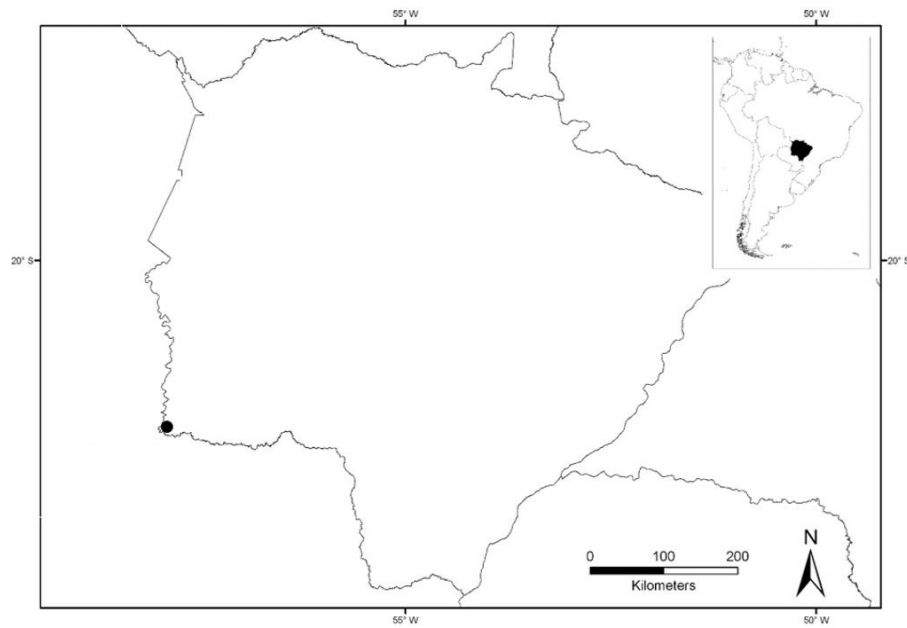


Figura 2.

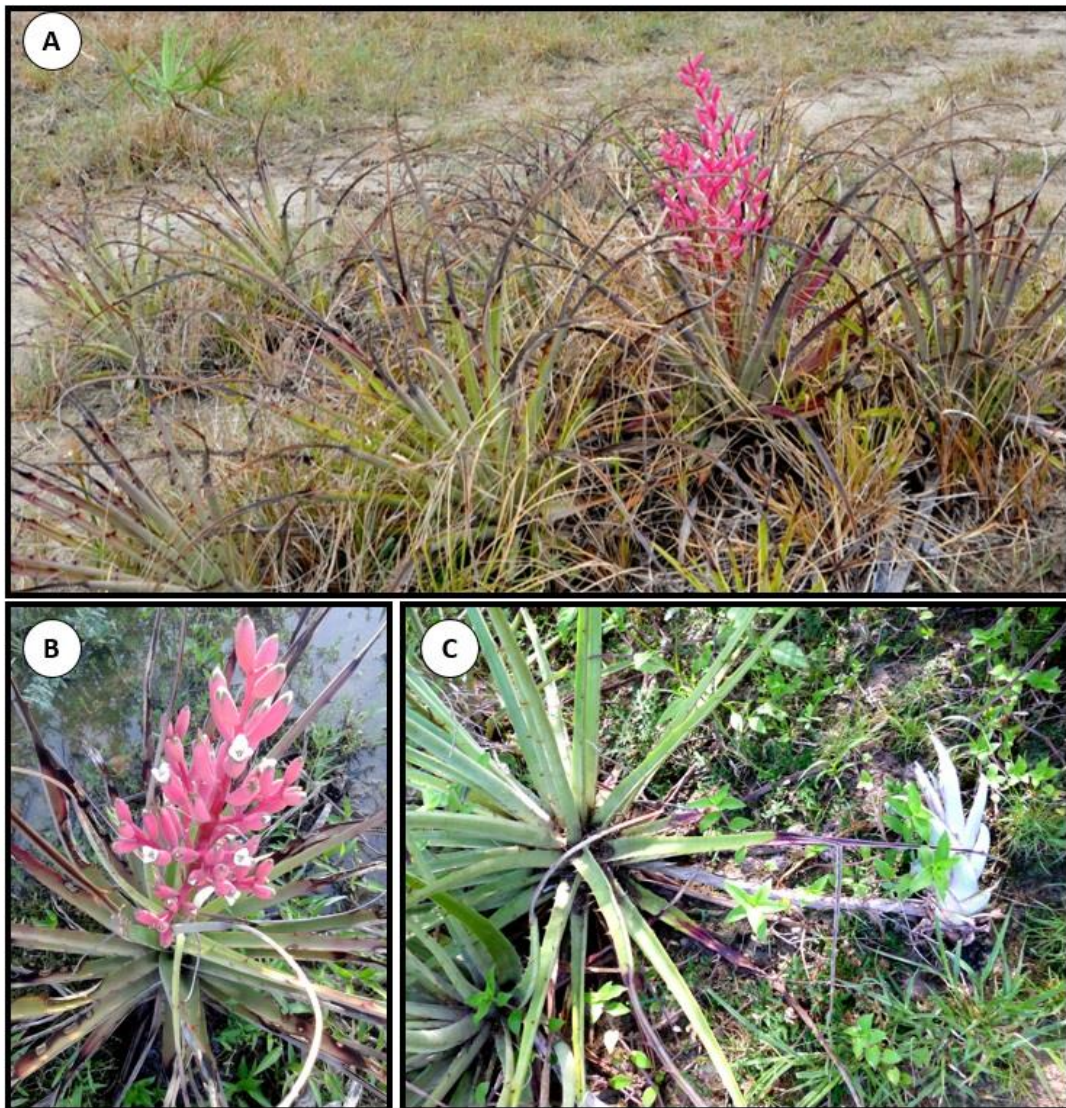


Figura 3.

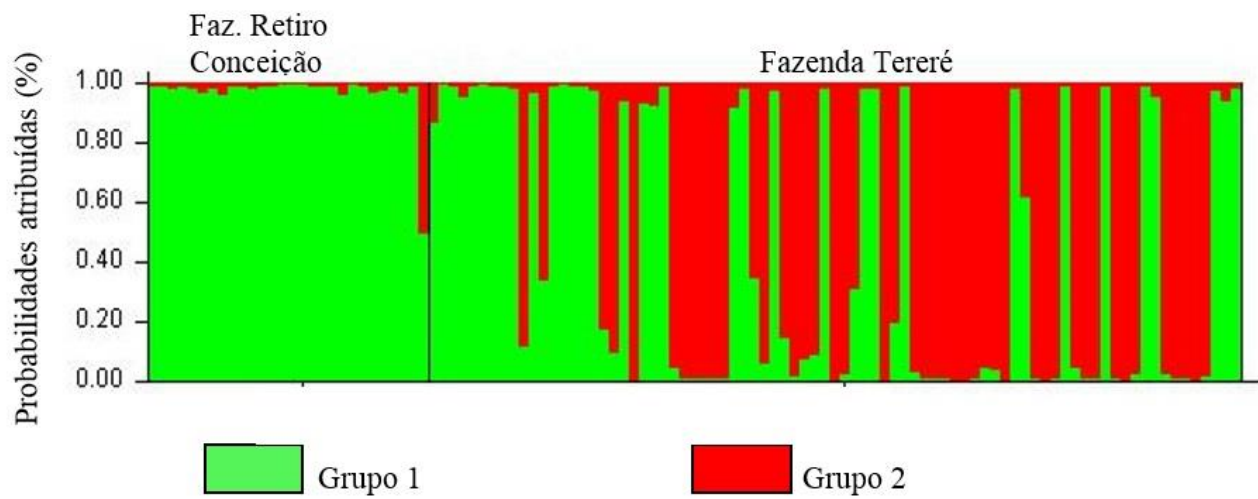


Figura 4.

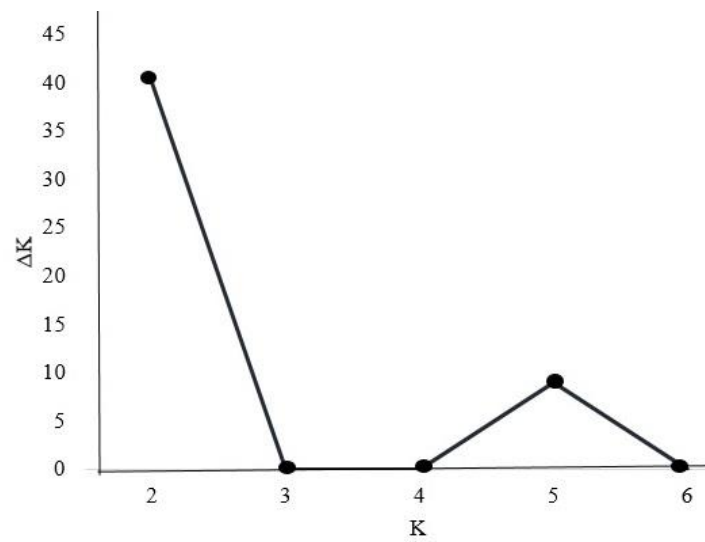
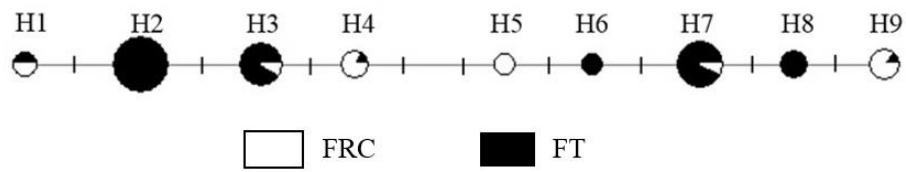


Figura 5.



5. Considerações finais

Este trabalho descreve a diversidade genética e o sistema reprodutivo de *Bromelia hieronymi*, que é uma espécie de ocorrência restrita ao bioma Chaco, ocorrendo em áreas de solo arenoso com pouca drenagem, que impõe condições ambientais severas a espécie. Este estudo é o primeiro estudo sobre aspectos genéticos e reprodutivos de uma espécie de Bromeliaceae do Chaco úmido brasileiro.

Para descrever a diversidade genética utilizou-se marcadores de microssatélites nucleares e plastidiais que foram descritos para outras espécies de Bromeliaceae. Através das análises genéticas, este estudo demonstrou que a espécie ainda conserva altos níveis de diversidade genética em comparação com os encontrados em outras espécies de bromélias (Barbará *et al.*, 2007; Barbará *et al.*, 2007; Palma-Silva *et al.*, 2009; Zanella *et al.*, 2011; Goetze *et al.*, 2013). Além disso, foram observados baixa estruturação genética e alto fluxo gênico entre as duas populações de *B. hieronymi*, sendo que dois grupos genéticos foram formados, o que pode estar relacionado a alogamia e a reprodução clonal apresentada pela espécie.

A alta diversidade genética observada em *B. hieronymi* é importante para a sobrevivência e manutenção das populações naturais em longo prazo, porém ainda são necessárias estratégias de conservação para evitar o aumento da diferenciação genética e conservar os altos índices de diversidade genética encontrados.

A taxa de fluxo de pólen em relação ao fluxo de semente mostrou um fluxo gênico mais eficiente via sementes em *B. hieronymi*, o que se justificaria pelo fato da espécie formar frutos carnosos e estes possivelmente estarem sendo consumidos por mamíferos e aves, atuando como possíveis dispersores de suas sementes.

A análise da fertilidade natural e a caracterização do sistema reprodutivo (sexuado e assexuado) preferencial da espécie foi avaliada através de observações e de experimentos de polinização. O estudo revelou que *B. hieronymi* é alogâmica, auto-incompatível, partenocárpica

e clonal. Observou-se que *B. hieronymi* forma sementes férteis apenas por meio da xenogamia, necessitando obrigatoriamente de agentes externos para obter sucesso nos processos de polinização. A partenocarpia pode estar relacionada a estratégias de dispersão e a proteção contra predação das sementes. O sistema de cruzamento alógamo pode estar contribuindo, em longo prazo, para o fluxo gênico via sementes, observado entre as duas populações de *B. hieronymi*. Foi observado que a espécie emite por planta de um a três estolões aéreos ao mesmo tempo, e que a estratégia de crescimento e de ocupação do ambiente pela espécie se dá pela produção destes longos estolões aéreos. A combinação dos sistemas assexuado e sexuado poderia estar contribuindo, a curto e longo prazo, respectivamente, com os altos índices de diversidade genética observados.

Apesar dos altos índices de diversidade genética apresentados e de seu sistema de cruzamento estar contribuindo para isto, a fragmentação de seu habitat no Chaco úmido, devido a atividades de pecuária, queimadas, e também do constante extrativismo nessa região, colocam em risco sua permanência no ambiente, já que suas populações não estão protegidas em unidades de conservação. Desta forma, os resultados acima citados são importantes por fornecerem informações sobre a manutenção da variabilidade genética de uma espécie representativa da fitofisionomia chaquenha da região sul-mato-grossense, e também por subsidiar o estabelecimento de planos de manejo e conservação de *B. hieronymi*.

6. Anexos



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

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

Número: 44824-1	Data da Emissão: 17/06/2014 20:10
Dados do titular	
Nome: FERNANDA MARIA DE RUSSO GODOY	CPF: 045.908.821-16

Observações e ressalvas

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

Táxons autorizados

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

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 46796869



Página 1/1



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.