

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**HÁBITO CLONAL E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES
ENDÊMICAS DE *LYMANIA AZUREA* E *LYMANIA SMITHII*
(BROMELIACEAE): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO**

VANESSA DE CARVALHO CAYRES PAMPONÉT

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2008**

VANESSA DE CARVALHO CAYRES PAMPONÉT

**HÁBITO CLONAL E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES
ENDÊMICAS DE *LYMANIA AZUREA* E *LYMANIA SMITHII*
(BROMELIACEAE): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2008

P186 Pamponét, Vanessa de Carvalho Cayres.
Hábito clonal e diversidade genética em populações endêmicas de
Lymania azurea e Lymania smithii (Brome-
liaceae): implicações para a
conservação / Vanessa de Carvalho Cayres Pamponét. – Ilhéus, BA :
UESC, 2008.
x, 72f. : il. .

Orientadora : Fernanda A. Gaiotto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética
e Biologia Molecular.
Inclui bibliografia.

**1. Genética vegetal. 2. Diversidade genética. 3. Conser-
vação biológica. 4. Mata Atlântica (BA). 5. Bromeliaceae.
6. Epífitas. I. Título.**

CDD581.3

VANESSA DE CARVALHO CAYRES PAMPONÉT

HÁBITO CLONAL E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES
ENDÊMICAS DE *LYMANIA AZUREA* E *LYMANIA SMITHII*
(BROMELIACEAE): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia
Molecular

APROVADA:

Prof. Dr. Cássio Van Den Berg
(UEFS-BA)

Prof^a. Dr^a. Ana Yamaguishi Ciampi
(Embrapa/Cenargem-DF)

Prof^a. Dr^a. Romari Alejandra M. Montano
(UESC-BA)

Prof^a. Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC-BA / Orientadora)

DEDICATÓRIA

*Ao meu filho Danilo, ao meu esposo Thed, aos
meus pais e irmãos. À minha família,
meu alicerce, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, o grande criador e minha fortaleza espiritual. Obrigada por tudo.

Ao meu esposo, que com grande empenho, me ajudou a tornar esse sonho realidade.

Ao meu filhinho, Dan, por ser um garotinho sempre muito compreensivo.

Aos meus pais, irmãos e familiares pelo incentivo.

À minha orientadora Fernanda Gaiotto, obrigada pela compreensão e ensinamentos, que vão além da genética, uma profissional exemplar e modelo a ser seguido.

A Co-orientadora Talita Fontoura pelo suporte nas coletas e ao co-orientador Ronan Xavier pelo suporte científico.

Aos professores Marco Antônio Costa, Delmira Silva e Romari Martinez, que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos professores da UESB Paulo Carneiro, Ana Maria Waldschmidt e Derval Gomes Pereira, que tiveram importante participação na minha iniciação acadêmica e científica.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESB e Fundação Biodiversitas pelo apoio financeiro.

À UESC e Programa e Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em nome de todos os funcionários e colegas.

À Lídia, companheira de estudos na fase da seleção e nas disciplinas. Agradeço pelos momentos de amizade e palavras que me confortaram em momentos difíceis.

À Claudine, por toda cooperação e aos ensinamentos na bancada do laboratório, desde os tempos da UESB.

À Maria e Felipe, companheiros nas coletas das plantas.

Aos colegas de laboratório Paloma, Jeiza, Fernanda, Vinícius, Juliana, por toda ajuda oferecida.

*“... Sei que tudo tem seu tempo, mas
sei que o tempo é curto e a
estrada é longa demais...”*
Manno Goés e Mané Filho

ÍNDICE

EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 A família Bromeliaceae.....	04
2.1.1 Sistemática.....	04
2.1.2 Distribuição geográfica e hábito.....	04
2.1.3 Importância ecológica.....	05
2.1.4 O gênero <i>Lymania</i>	05
2.1.5 <i>Lymania smithii</i>	07
2.1.6 <i>Lymania azurea</i>	08
2.1.7 As ameaças para o gênero <i>Lymania</i>	09
2.2 Importância da manutenção da variabilidade genética e implicações para a conservação de espécies.....	10
2.3 Estrutura genética de plantas clonais.....	12
2.4 Marcadores para o estudo da estrutura genética de populações.....	13
2.4.1 RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>).....	14
2.5 Análise de Variância Molecular (AMOVA).....	16
3. CAPÍTULO 1: Diversidade Clonal em Populações de <i>Lymania azurea</i> (Bromeliaceae) detectada Através de Marcadores RAPD.....	17
Abstract.....	18
Resumo.....	20
1. Introdução	22
2. Material e Métodos.....	23
3. Resultados e Discussão.....	26
Agradecimentos	30
Referências Bibliográficas.....	31

Tabelas	33
Figuras	34
4. CAPÍTULO 2: Diversidade genética em espécies endêmicas de <i>Lymania sp.</i> (Bromeliaceae): Implicações para a conservação	
Resumo.....	38
1. Introdução	39
2. Material e Métodos.....	40
2.1 Critérios gerais de amostragem.....	40
2.1.1 Amostragem de <i>Lymania azurea</i>	41
2.1.2 Amostragem de <i>Lymania smithii</i>	41
2.2 Análise RAPD.....	42
2.2.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	42
2.2.2 Reações de PCR.....	42
2.2.3 Seleção de <i>primers</i>	43
2.2.4 Classificação de marcadores.....	43
2.3 Análise estatística dos dados.....	43
3. Resultados e Discussão.....	44
3.1 Análise RAPD.....	45
3.1.1 Seleção de <i>primers</i>	45
3.1.2 Classificação de marcadores.....	45
3.1.2.1 <i>Lymania azurea</i>	45
3.1.2.2 <i>Lymania smithii</i>	46
3.2 Diversidade e Estrutura Genética.....	48
3.2.1 <i>Lymania azurea</i>	48
3.2.2 <i>Lymania smithii</i>	53
3.3 Implicações para a conservação.....	58
4. Conclusões.....	60
5. Referências Bibliográficas.....	61
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....	66

EXTRATO

PAMPONÉT, Vanessa de Carvalho Cayres, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, fevereiro de 2008. **Hábito clonal e diversidade genética em populações endêmicas de *Lymania azurea* e *Lymania smithii* (Bromeliaceae): implicações para a conservação.** Orientadora: Fernanda Amato Gaiotto. Co-orientadores: Talita Fontoura Alves e Ronan Xavier Côrrea

O gênero *Lymania* Read, endêmico da Mata Atlântica, do sul da Bahia, é caracterizado por ser epífita e de hábito clonal. No hábito clonal uma planta é formada por *ramets* conectados a um mesmo estolão. O agrupamento de *ramets* constitui um único indivíduo, chamado *genet*. No capítulo 1 da presente dissertação foi investigado níveis de diversidade genética entre *ramets*. No capítulo 2, foi analisada a diversidade e estrutura genética em populações de *Lymania azurea* e *Lymania smithii*, visando gerar informações úteis para conservação de *L. azurea* que apresenta distribuição geográfica muito restrita e, está listada como espécie “em perigo” de extinção, pela Fundação Biodiversitas, devido a desmatamentos e fragmentação dos habitats. *L. smithii*, por sua vez, tem a distribuição mais ampla do gênero. A análise comparativa da diversidade genética nas espécies estudadas visou compreender as diferenças de distribuição geográfica entre as espécies simpátricas. A amostragem foi estruturada em nível de *ramets* por *genets*. Foram avaliadas quatro subpopulações, uma em Ilhéus-BA (Sapucaieira) e três em Una-BA (PRCP I, II e Piedade). A variabilidade genética foi acessada por marcadores moleculares RAPD. As subpopulações foram analisadas pelo índice de similaridade de Jaccard e pela Análise Molecular de Variância (AMOVA). As análises estatísticas permitiram constatar variabilidade genética dentro de *genets*, de modo que eram esperados 19 *genets* formando grupos com similaridade um, e ocorreram apenas dois grupos com $S=1$. Dentre algumas hipóteses que buscam explicar o resultado obtido, mutações somáticas podem estar adicionando diversidade genética entre clones. Pesquisas mais aprofundadas sobre aspectos biológicos de plantas clonais

são necessárias no propósito de melhor explicar o resultado encontrado neste trabalho e em trabalhos prévios com outras espécies. No capítulo dois, foi verificada maior diversidade genética em *L. smithii*. Além disso, notou-se que a maior parte da variabilidade genética da espécie *L. azurea* encontra-se dentro de subpopulações. O Φ_{ST} estimado, que mede a endogamia devido à subdivisão das populações, foi de 0,2 em *L. azurea* e 0,1 em *L. smithii*. Ao analisar pares de subpopulações em *L. azurea*, o par de subpopulações coletadas dentro da Reserva Biológica de Una-BA, revelou menor índice de estrutura genética ($\Phi_{ST} = 0,09$). A maior estrutura ($\Phi_{ST} = 0,37$) foi entre subpopulações sob forte efeito antrópico (Sapucaieira e PRCP II). O fluxo gênico deve estar muito limitado com conseqüente deriva genética causando redução da variabilidade genética em populações menores. Deste modo, foi sugerido que a conservação *ex situ*, amostrando preferencialmente sementes, pode ser uma boa estratégia para a conservação de *L. azurea*. Contudo, a conservação *in situ* é mais recomendada por favorecer o potencial evolutivo da espécie. Assim é necessário estabelecer unidades de conservação nos fragmentos de mata onde ocorrem espécies de *Lymania azurea* associados a corredores ecológicos que permitam a troca de alelos

Palavras-chave: Mata Atlântica, Conservação, RAPD, Epífitas, Estrutura Genética.

ABSTRACT

PAMPONÉT, Vanessa de Carvalho Cayres, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, february of 2008. **Clonal habit and genetic diversity in the endemic populations of *Lymania* sp. (Bromeliaceae): Implications for conservation.** Adviser: Fernanda Amato Gaiotto. Co-adviser: Talita Fontoura Alves e Ronan Xavier Côrrea

The *Lymania* Read genus, endemic to the Atlantic forest, southern of Bahia, is characterized as epiphyte and has clonal habit. Clonal habit plants are formed by ramets connected to only one stolon. Ramets groups form a single individual, called genet. The aim of the first chapter of this dissertation was to investigate the levels of genetic diversity among ramets. Chapter two analyzed the diversity and genetic structure of *Lymania azurea* and *Lymania smithii* populations in order to generate useful information for conservation of *Lymania azurea*. Considering that it has a restricted geographic distribution and is listed as a species “in danger” of extinction by Biodiversitas Foundation, due to deforestation and habitat loss. *Lymania smithii*, in its turn, has the widest distribution of its genus. Comparative analysis of genetic diversity for the studied species was aimed to understanding differences in geographical distribution among the sympatric species. Sampling was structured to consider ramets per genet. Four subpopulations, one in Ilhéus-BA (Sapucaieira) and three in Una-BA (PRCP I, PRCP II and Piedade) were studied. The genetic variability was evaluated by RAPD. The subpopulations were analyzed by Jaccard’s similarity index and Analysis of Molecular Variance (AMOVA). The statistical analyses showed genetic variability inside the genets. Nineteen genets were expected to form groups with similarity one, but only two groups showed $S=1$. Among the hypotheses that could explain these results, one considers that somatic mutations could be adding

genetic diversity among clones. More accurate researches on biological aspects of clonal plants are needed to better explain the results found in this study and in previous studies for other species. Results in chapter two showed a greater genetic diversity in *L. smithii*. Moreover, most of *L. azurea* genetic variability was found inside subpopulations. The Φ_{ST} estimated, which measures endogamy due to populations subdivision, was 0.2 in *L. azurea* and 0.1 in *L. smithii*. During the analysis of pairs from *L. azurea* subpopulations, the pair of subpopulations collected inside the Biological Reserve of Una-BA, revealed a small genetic structure index ($\Phi_{ST} = 0.09$). The biggest structure ($\Phi_{ST} = 0.37$) was found in subpopulations under strong anthropic effect (Sapucaieira and PRCP II). Possibly, gene flow is limited due to genetic drift caused by genetic variability loss in small populations. Hence, it was suggested that conservation *ex situ*, sampling seeds, can be a good strategy for conservation of *L. azurea*. However, conservation *in situ* is more recommended, due to the fact that it favors the species' evolutionary potential. Thus it is necessary to establish conservation units in forest fragments where *L. azurea* occurs, as well as ecological corridors to allow alleles exchange.

Key-words: Atlantic Forest, Conservation, RAPD, Epiphyte, Genetic Structure.

1. INTRODUÇÃO

Bromélias são reconhecidas pelo importante papel ecológico que desempenham na natureza. Em grande parte das espécies, o tanque, formado pelas bainhas das folhas, é um importante reservatório de água, do qual dependem, direta ou indiretamente, várias espécies de animais (SCARANO et al., 1997). Deste modo, estabelecem importantes interações ecológicas, sendo de grande importância para a conservação da biodiversidade.

Muitas bromélias têm merecido destaque devido à sua importância econômica como plantas ornamentais, sendo atualmente muito cultivadas e utilizadas na decoração de interiores e em projetos paisagísticos. Alguns gêneros são endêmicos da Floresta Atlântica e em função dessa procura, a sua retirada dos ambientes naturais constitui ameaça a algumas espécies.

O gênero *Lymania* Read, objeto de estudo, em sua grande maioria é epífita e endêmico da Mata Atlântica sul baiana. Plantas epífitas podem ser dizimadas por perda de habitat através de modificações no meio ambiente que provoquem um decréscimo no número de espécies arbóreas na região de ocorrência (DE SOUSA, 2004).

A região sul da Bahia apresenta suas áreas de Floresta Atlântica em diversos estados de conservação, cerca de 47,4% da região sul da Bahia é ocupada por pastagens e agricultura e 13,7% por florestas em estágios iniciais de regeneração (LANDAU, 2003). Os remanescentes florestais constituem unidades de conservação governamentais e Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPNs) que necessitam de informações básicas sobre os recursos naturais existentes para que se possam manter conservados.

Biólogos conservacionistas acrescentam que o declínio na variação genética limita o potencial evolutivo, possibilitando o risco de extinção (ZUCCHI, 2002). Assim, conhecer a diversidade genética é a base para subsidiar programas de conservação.

Além da ausência de dados sobre a ocorrência de espécies de *Lymania* nas várias áreas de mata, nenhum estudo populacional ou sobre a variabilidade genética foi desenvolvido até a presente data. Uma das características mais marcantes do gênero é o crescimento clonal, que caracteriza um grupo de rosetas (*ramets*) conectadas por um estolão. O agrupamento de *ramets*, que são clones entre si, constitui um único indivíduo denominado *genet* (DE SOUSA, 2004). Logo, em plantas clonais a variabilidade genética deve ocorrer apenas entre *genets* e não entre *ramets* do mesmo *genet*.

Contudo, estudos prévios com espécies clonais detectaram níveis de diversidade genética entre clones, como relatados nos trabalhos de Ayres e Ryan (1999); Bush e Mulcahy (1999); Bushakra et al. (1999); Cavallari et al. (2006); Esselman et al. (1999); Fisher et al. (2000); Kreher et al. (2000); Persson e Gustavsson (2001).

Tendo em vista a conservação, a ocorrência de diversidade genética entre clones, é importante ao definir o tamanho efetivo da população a ser conservada.

Lymania azurea Leme foi escolhida por ser uma espécie que está ameaçada de extinção, pela Fundação Biodiversitas, necessitando de estudos básicos sobre a variabilidade genética. A outra espécie estudada foi *Lymania smithii* Read que ocorre em simpatria com *L. azurea* e com a qual compartilha algumas semelhanças morfológicas. Esta foi escolhida para análise genética por possuir distribuição muito ampla. Deste modo, uma análise comparativa da diversidade entre as espécies pode auxiliar na compreensão dos motivos da diferença existente na distribuição espacial destas espécies, bem como avaliar as conseqüências dos impactos ambientais em cada espécie.

Dentre diversos marcadores moleculares disponíveis atualmente, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) mostram-se uma ferramenta útil para a análise da diversidade genética molecular em populações naturais de plantas. A técnica é simples e aplicável a qualquer organismo, uma vez que não é necessário o conhecimento prévio de seqüências-alvo no DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Assim, o conhecimento da variabilidade genética nas populações pode ser utilizado para auxiliar na definição de unidades de conservação e prioridades para o manejo de recursos genéticos, indicando áreas e populações de maior ou menor

importância para a preservação do táxon em questão, permitindo o desenvolvimento de estratégias de conservação mais eficientes.

Tendo em vista o exposto, para atingir os objetivos propostos, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos:

1. Analisar em *Lymania azurea* os níveis de diversidade genética entre ramets, a fim de verificar o hábito clonal descrito para a espécie.
2. Avaliar a diversidade genética em populações de *Lymania azurea* e *Lymania smithii*, a fim de: (i) compreender os diferentes níveis de variabilidade genética destas espécies simpátricas, porém com diferenças significativas de distribuição na floresta e, (ii) gerar dados que possam ser utilizados para subsidiar programas de conservação, já que a variabilidade genética é fundamental para o potencial evolutivo de uma espécie e para determinar suas chances de sobrevivência em longo prazo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Bromeliaceae

2.1.1 Sistemática

De acordo com o sistema APG, *Angiosperm Phylogeny Group* (BREMER et al., 1998), as bromélias pertencem ao grupo das Comelinídeas. Chase et al. (2000) as posicionam na ordem Poales compreende aproximadamente 56 gêneros e 2885 espécies (LUTHER, 2000). Segundo Cronquist (1981), Bromeliaceae é única família da ordem Bromeliales, subclasse Zingiberidae, classe Liliopsida. São conhecidas três subfamílias para Bromeliaceae: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae. A diferenciação entre as três subfamílias é baseada em características morfológicas tais como tipo de frutos e sementes, margem das folhas e posição do ovário (SMITH e DOWNS, 1979).

2.1.2 Distribuição geográfica e hábito

As espécies da família Bromeliaceae estão distribuídas das zonas tropicais às zonas subtropicais nas Américas, desde o Chile até o Sul dos Estados Unidos, podendo habitar em praticamente todos os ecossistemas neotropicais, e assim podem ser encontradas desde o nível do mar, em praias, mangues e restingas, até altitudes de 5000 m, nos Andes (LEME e MARIGO, 1993; MEDINA, 1990). Estima-se que cerca de 40% das espécies de Bromeliaceae sejam encontradas no Brasil (LEME, 1997).

Bromélias podem ser terrestres, epífitas ou rupícolas a depender do ecossistema em que se encontram. No entanto são epífitas em sua maioria (SANTOS et al., 2004) e utilizam como substrato o caule de outras árvores. Embora 10 % da flora vascular do mundo sejam epífitas (KRESS, 1986), os dados genéticos

de populações de epífitas são muito escassos. Somente algumas samambaias, orquídeas e bromélias foram estudadas geneticamente (GONZÁLEZ-ASTORGA, 2004).

2.1.3 Importância ecológica

Bromélias apresentam-se associadas a diversos organismos, isso ocorre por conta das características morfológicas presentes nessas plantas, o que as torna importantes para a manutenção e conservação da diversidade biológica dos ambientes onde estão inseridas (LEME, 1997; ROCHA et al.,2004).

Para Rommel e Baights (1999), as bromélias são microecossistemas muito particulares. O meio criado em uma bromélia pode ser comparado a um pântano permanente elevado acima do solo, cuja água procede de uma condensação cotidiana da água atmosférica. Estas plantas desenvolvem-se com uma fauna associada em uma relação do tipo mutualismo com certa interdependência e coevolução (ROMMEL E BAIGHTS, 1999).

Portanto, estas plantas apresentam importância ecológica associada à capacidade de armazenar água e nutrientes em seu tanque, estabelecendo relações mutualistas com outros organismos, o que a torna elemento fundamental para a ampliação de diversidade de habitats (ROCHA et al.,2004).

2.1.4 O gênero *Lymania*

Na subfamília Bromelioideae está incluído o gênero *Lymania* que baseado no último estudo taxonômico, só ocorre nas matas do sul da Bahia (DE SOUZA, 2007), o que aponta a vulnerabilidade desse gênero de distribuição geográfica muito restrita.

Uma das características mais marcantes do grupo é a forma de crescimento clonal. A planta é estruturada por rosetas (*ramets*) conectadas a um estolão, que dá um aspecto de trepadeira. Cada agrupamento de *ramets*, unidos por um mesmo estolão, são formados por clones e constituem um único indivíduo denominado *genet* (Fig. 1). Esse mecanismo possibilita a sobrevivência em ambientes hostis, com poucos recursos, devido à maior captação de água e nutrientes pelos vários *ramets* do indivíduo(LEME, 1997).

Os *genets* formados sobre os troncos podem variar entre 2 a 10 *ramets* (BENZING, 2000). O gênero pode ser reconhecido também por possuir ovário sulcado ou alado, pétalas sem apêndices, sépalas assimétricas que não apresentam espinhos no ápice e brácteas florais ausentes ou muito pequenas (DE SOUSA et al., 2007).



Figura 1 – Representação do crescimento clonal e *L. smithii* (a) e *L. azurea* (b).

Lymania foi o primeiro gênero da subfamília Bromelioideae a ser submetido a uma análise combinada morfológica e molecular. De Sousa et al. (2007) realizaram uma análise cladística em *Lymania* utilizando morfologia e sequências de três regiões de cpDNA: a *matK* região codificante e os *psbA - trnH* e *trnL - trnF* espaçadores intergênicos. Nas espécies do Gênero *Lymania*, ocorreu uma divisão em dois clados. Um clado formado pelas espécies *L. alvimii* Read, *L. spiculata* Leme e Forzza, *L. azurea* Leme e *L. smithii* Read unidas pela presença de bráctea escapal e ovário sulcado (Fig. 2). O segundo clado agrupou as espécies *L. brachycaulis* Baker, *L. corallina* Read e *L. globosa* Leme unidas pelo comprimento da flor, sépalas agudas bicarenadas e ovário alado. Embora cada um desses caracteres apresente

homoplasias dentro de Bromelioideae como um todo, eles são inequivocamente sinapomorficas dentro de *Lymania* (DE SOUSA et al., 2007).

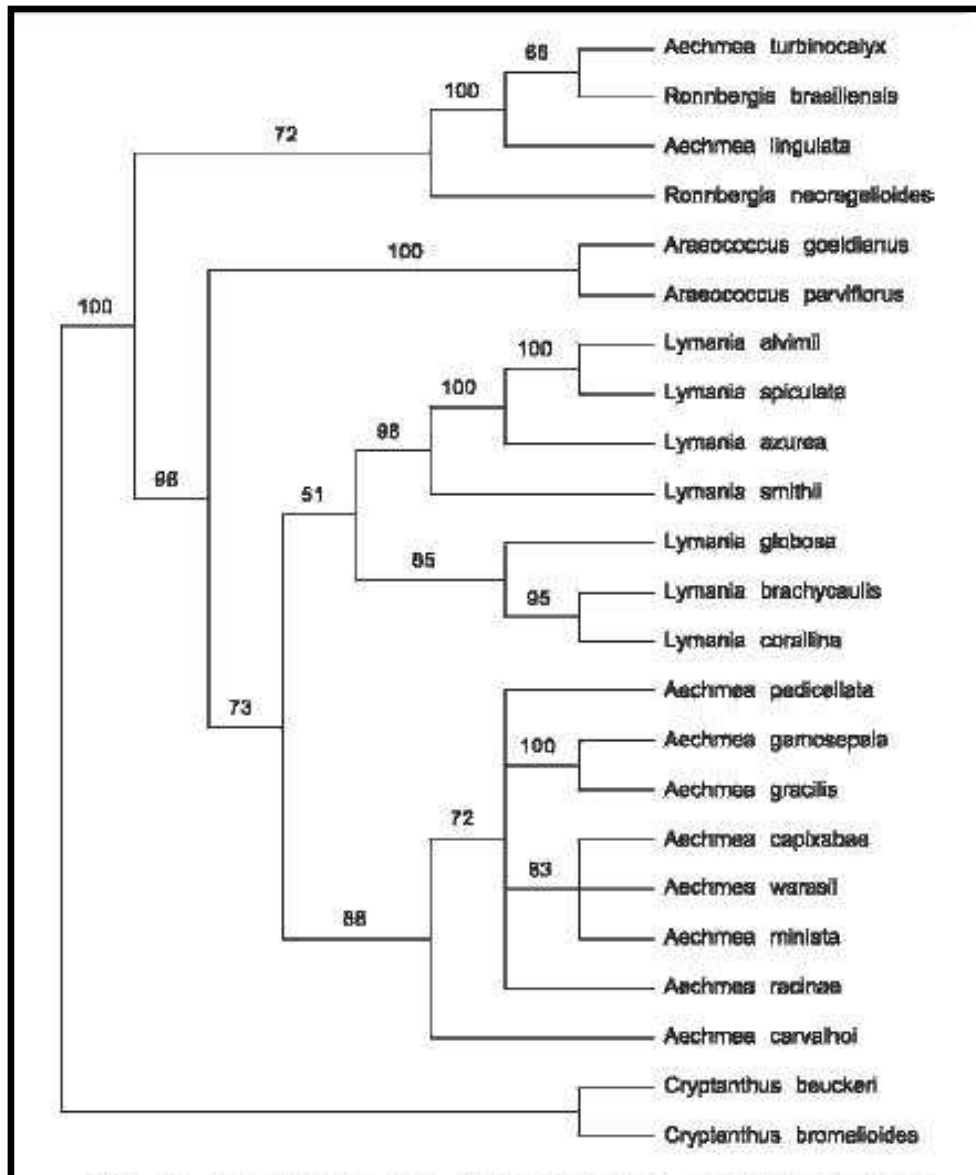


Figura 2 – Árvore consenso de análise Bayesiana para dados morfológicos e seqüências de cpDNA (DE SOUSA et al, 2007).

2.1.5 *Lymania smithii*

Lymania smithii Read, (Fig.3) é a espécie que possui a distribuição mais ampla do gênero, sendo encontrada na Costa Atlântica de Ituberá-BA a Canavieiras-BA e um registro para o município de Cravolândia, quase no extremo oriente da

mata Atlântica baiana. Leme e Forzza (2001) alertam para a existência dessa espécie em Pernambuco, contudo De Sousa (2004) relata que esse dado deve ser melhor investigado, pois em seu trabalho não foi encontrado nenhum registro dessa espécie. *L. smithii* é encontrada comumente em troncos baixos na Mata Atlântica ou em restinga arbórea.



Figura 3 – *Lymania smithii*. Foto retirada na Rebio-Una-BA, arquivo pessoal.

2.1.6 *Lymania azurea*

Lymania azurea Leme, (Fig.4) endêmica do centro sul do Estado da Bahia, tem ocorrências descritas nos municípios de Buerarema, Ilhéus-BA e Una-BA. Pouco se conhece sobre a biologia desta espécie. De Souza et al. (2007), descrevem que em *L. azurea* os sulcos do ovário desaparecem durante o desenvolvimento do fruto, o que não acontece com as outras espécies do gênero. Outra particularidade da espécie é a parte basal do ovário, bem mais estreita, onde os sulcos são mais evidentes. Nas outras espécies os sulcos estão distribuídos mais uniformemente por todo o comprimento do ovário.

Esta espécie ocorre em simpatria, no município de Una-BA, com *Lymania smithii*, com a qual apresenta algumas semelhanças no porte e forma de roseta. No entanto, *L. azurea* possui flores bem maiores que *L. smithii* e um número bem menor de flores por ramo (DE SOUSA et al., 2007).



Figura 4 – *Lymania azurea*. Foto retirada na Rebio-Una-BA, arquivo pessoal

2.1.7 As ameaças para o gênero *Lymania*

Efeitos como a queda de árvores, formação de clareiras, queimadas naturais ou inundações não interferem no processo natural de sucessão ecológica. Mas a rápida modificação de habitats florestais causadas pela ação antrópica dificulta a recuperação do ambiente como ocorre na Mata Atlântica. Tal interferência pode levar à diminuição de espécies locais, fragmentação da floresta e alteração de ciclos ecológicos, podendo causar extinção local.

Adicionado aos fatores de ameaça mencionados acima, o gênero *Lymania*, possui distribuição restrita e endemismo da maioria das espécies, o que as torna altamente vulneráveis.

Entre as espécies existentes, *Lymania azurea*, encontra-se listada na categoria “em perigo” pela Fundação Biodiversitas, divulgado no “workshop de revisão da Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção” realizado de 07 a 11/06/2005 em Belo Horizonte, Minas Gerais, segundo o Decreto Lei n.º 750/93, que definiu 1537 espécies ameaçadas de extinção (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2006).

2.2 Importâncias da manutenção da variabilidade genética e implicações para a conservação de espécies

Atualmente, o conhecimento da estrutura genética de populações é entendido como etapa fundamental para a realização de programas conservacionistas (CAVALLARI et al., 2006). Considerando que a manutenção do padrão de diversidade genética para cada espécie é essencial para a preservação do potencial evolutivo (FLEISHMAN et al., 2001).

Os níveis de variabilidade genética intra e inter-populacional refletem as interações de processos diferentes, incluindo a história ecológica e evolutiva, a curto e longo prazo, respondendo a efeitos da fragmentação do habitat, de deslocamentos na distribuição e de isolamento da população. Além disso, outros fatores podem influenciar a estrutura genética de populações de plantas, tais como: sistema reprodutivo, mecanismos de dispersão de sementes, bem como a redução no tamanho da população devido à baixa diversidade (CAVALLARI et al., 2006).

Os fatores citados acima podem interferir em vários fenômenos genéticos como endogamia, gargalos populacionais, efeito fundador, fluxo gênico, seleção natural, deriva genética e mutação (HARTL e CLARK, 1997). Assim, esses fatores associados têm implicações diretas no estudo da genética populacional de plantas visando a conservação de espécies.

Nas últimas décadas, a extinção de variadas formas de vida tem aumentado consideravelmente. Dentre os fatores envolvidos com a extinção de espécies, a fragmentação de habitats expõe uma determinada espécie aos efeitos de endogamia e da deriva genética que ocorrem naturalmente em qualquer população, mas que são prejudiciais para populações grandes. Populações pequenas e isoladas são mais sujeitas aos efeitos da endogamia e da deriva genética, revelando menor variabilidade genética populacional, como consequência (BOUZART, 2001).

Deste modo, a compreensão adequada dos fatores que influenciam o tamanho efetivo em populações pequenas é especialmente importante, sendo estas favoráveis para conservação (CHUNG et al., 2005).

A quantificação da diversidade genética intra-específica, ou seja, nas populações, contribui para a investigação e monitoramento do impacto da fragmentação sobre as espécies ameaçadas. Atualmente, a genética da conservação utiliza várias técnicas moleculares para estimar o risco de extinção das espécies.

A erosão genética (perda da variabilidade dentro das espécies) deve ser reduzida. Considerando que, a perda da variabilidade genética resulta em baixo potencial evolutivo e pode provocar a redução do *fitness* (adaptabilidade ou valor adaptativo), tanto do indivíduo quanto da população (BOUZART, 2001). Assim, o desenvolvimento de estratégias de conservação, envolvendo conservação *ex situ* e *in situ*, são importantes para evitar a extinção local de espécies.

As pesquisas em diversidade genética podem identificar populações ou grupos de populações prioritárias para a conservação. CAVALLARI et al., 2006 ao analisarem a diversidade genética em três espécies do gênero *Encholirium* (Bromeliaceae) definiu entre as espécies *E. biflorum* e *E. pedicellatum*, espécies criticamente ameaçadas de extinção, que a retirada de um único indivíduo do *habitat* implica em perda significativa da diversidade genética na natureza, e portanto, deve ser evitada. Estes autores apontam também alguns centros de alta diversidade que estão desprotegidos na Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, como o Pico das Almas, a Serra do Barbado, o Planalto de Diamantina e a serra do Grão-Mogol.

Deve-se ressaltar que espécies raras ou endêmicas normalmente apresentam variabilidade genética reduzida, por apresentarem populações pequenas e isoladas (BROWN, 1999). Porém, em alguns casos, não há relação entre tamanho e distribuição da população com o nível de variabilidade genética.

Muitos endemismos, por exemplo, encontram sua explicação em fatos históricos conhecidos, como refúgios de glaciações (FUTUYMA, 1997). Assim, muitas populações de distribuição restrita convivem com a baixa variabilidade. Contudo, a falta de registros mais antigos impossibilita afirmar se a reduzida variabilidade genética encontrada em determinada espécie é devido às flutuações demográficas recentes ou de um padrão histórico da espécie (MATOCQ e VILLABLANCA, 2001).

Muitos programas de conservação de plantas raras ou ameaçadas visam manter os níveis existentes de variabilidade genética, evidenciando a importância de pesquisas em genética de populações para a conservação de espécies (CAVALLARI et al., 2006). Acredita-se, como hipótese de trabalho que populações de tamanho populacional pequeno têm, em geral, menos variabilidade genética do que as populações com ampla distribuição e, conseqüentemente, são mais vulneráveis à extinção quando as condições do meio ambiente alteram.

2.3 Estrutura genética em plantas clonais

Espécies que possuem propagação vegetativa apresentam particularidades em relação à estrutura genética de suas populações, e seu estudo merece atenção especial devido à formação de clones. A reprodução assexuada possui importância evolutiva por transmitir os genótipos integralmente aos perfilhos, transmitindo assim a variância genética total, enquanto que a reprodução sexuada transmite apenas a variância genética aditiva (CAVALLARI et al., 2006).

A estratégia de crescimento clonal de uma espécie pode ser organizada em dois níveis: *genet* e *ramet*. Um *genet* é um indivíduo geneticamente idêntico, formado por clones, originados de um zigoto. Já um *ramet*, constitui-se parte potencialmente independente de um *genet*. Em Bromeliaceae, os *ramets* apresentam-se na forma de rosetas – perfilhos (com fenologia independente das demais rosetas do *genet*). Como a variação genética ocorre apenas entre *genets*, o tamanho efetivo das populações não pode ser determinado pela avaliação dos *ramets*, sendo necessário a princípio identificar os *genets* (PERSSON e GUSTAVSSON, 2001).

Em espécies de reprodução assexuada, portanto, é esperado um menor número de genótipos em relação ao número de indivíduos observados na população, uma vez que muitos deles podem pertencer ao mesmo *genet*.

Conforme Persson e Gustavsson (2001), em espécies clonais há baixa participação de reprodução sexuada na formação das populações, a contribuição das sementes é um evento raro, portanto espera-se que estas espécies apresentem menos diversidade genética do que espécies com reprodução exclusivamente sexuada. Vários estudos, porém, têm revelado níveis de diversidade genética molecular em espécies clonais similares aos encontrados em espécies de

reprodução sexuada (FISCHER et al., 2000; KREHER et al., 2000). Persson e Gustavsson (2001), por exemplo, relatam que a variabilidade genética molecular encontrada dentro de populações de amora alpina, *Vaccinium vitis-idaea*, uma espécie clonal, foi similar aquela normalmente relatada para plantas de reprodução exclusivamente sexuada.

Outra particularidade da estrutura genética de plantas clonais está relacionada aos efeitos da deriva genética. A deriva genética, que diminui a variabilidade genética de maneira inversamente proporcional ao tamanho efetivo da população a cada geração, é menos pronunciada nestas espécies (FISHER et al., 2000). Como a deriva só ocorre através da morte de uma geração e da substituição pela geração subsequente, a manutenção dos diferentes genótipos através de seus filhotes contribui para a conservação da variabilidade genética na população ao longo dos anos (AYRES e RYAN, 1999).

2.4 Marcadores para o estudo da estrutura genética de populações

Existem muitas maneiras de se acessar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O mais simples indicador de variabilidade genética é a própria variabilidade morfológica. Porém, características morfológicas podem ser influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade (ZUCCHI, 2002).

Para a determinação mais precisa e segura da variabilidade genética, é necessário utilizar características não influenciáveis pelo ambiente. Neste sentido, as técnicas de biologia molecular permitem o acesso ao polimorfismo diretamente no genoma dos organismos. Os marcadores moleculares abrem novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e biologia populacional como um todo, e têm sido largamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética.

Para um uso eficiente dos marcadores moleculares em estudos genéticos deve-se considerar a base genética do polimorfismo revelando os aspectos técnicos dos métodos e, as vantagens e limitações de cada marcador (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

2.4.1 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

O desenvolvimento da técnica de RAPD foi possível graças à descoberta do PCR na década de 80 (MULLIS e FALLONA, 1987). A possibilidade de síntese enzimática de milhões de cópias de um determinado segmento de DNA revolucionou as pesquisas em biologia molecular, e vários tipos de marcadores foram criados (ZUCCHI, 2002). Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis atualmente, os marcadores RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*, desenvolvida por Williams et al. (1990), afim de identificar marcadores genéticos para mapeamento, destaca-se pela simplicidade da técnica, entre outros fatores. O princípio da técnica baseia-se no uso de *primers* curtos e de seqüência arbitrária durante a reação de amplificação em cadeia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), eliminando a necessidade do conhecimento prévio da seqüência genômica da espécie a ser estudada. Vale ressaltar que os *primers* possuem seqüências arbitrárias, mas a amplificação não ocorre aleatoriamente e depende de sítios de anelamento no genoma. Deste modo, o *primer* se anela às seqüências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento do DNA entre dois *primers* adjacentes com o auxílio da enzima *Taq polimerase* (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Por serem pequenos é grande a possibilidade de que os *primers* encontrem diversas regiões do genoma para se anelarem, fazendo com que diversos fragmentos de tamanhos diferentes resultem de uma única reação (WILLIAMS et al., 1990). Um perfil RAPD será formado pelo conjunto de produtos de amplificação de diversos *primers* diferentes com alguns fragmentos cada. A separação dos produtos amplificados pode ser feita em eletroforese de gel de agarose com brometo de etídio ou em gel de poliacrilamida. O polimorfismo detectado por estes marcadores tem natureza binária, ou seja, um determinado fragmento ou banda está presente ou ausente no gel (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Fragmentos de tamanhos diferentes são consideradas locos diferentes (LACERDA, 2002).

A técnica possibilita a construção de mapas genéticos, o estabelecimento de similaridades genéticas entre diferentes indivíduos, a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, análise da diversidade genética molecular em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma (FERREIRA e

GRATTAPAGLIA, 1998), sendo largamente empregada para a caracterização de plantas (HUFF et al., 1993).

Entre as vantagens freqüentemente citadas para a técnica de RAPD, pode-se destacar: i) simplicidade, ii) rapidez, iii) baixo custo, iv) demanda de quantidades mínimas de DNA , v) capacidade multiplex e vi) análise em espécies sem nenhum tipo de informação genética.

No caso de espécies raras ou ameaçadas, nas quais o material biológico é escasso, RAPD é considerada uma técnica favorável por utilizar quantidades pequenas de tecido (CAETANO-ANOLLES et al., 1991). Em situações envolvendo a conservação, a velocidade com que as informações genéticas podem ser produzidas auxilia o delineamento de estratégias mais eficientes em curto prazo.

Outro aspecto particularmente interessante é ausência de necessidade de desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse. Esta técnica possibilita ainda, uma amostragem mais ampla do genoma, capacidade multiplex. Além disso, identificam um bom número de locos polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Entre as limitações da técnica, duas podem ser consideradas as mais importantes. A primeira delas se refere à característica dominante, que não permite discriminar genótipos heterozigóticos e, conseqüentemente, a obtenção de outras informações relevantes para estudos genéticos, baseadas em freqüências alélicas. Além disso, o RAPD ainda é questionado pela baixa repetibilidade experimental (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

As causas freqüentemente apontadas para justificar a baixa repetibilidade, são: (i) competição entre os sítios de ligação dos *primers* por substrato e reagentes, e (ii) problemas relacionados com a padronização de condições de amplificação, que envolvem alterações nas concentrações de reagentes e uso de diferentes termocicladores, os quais podem variar os perfis térmicos por aparelho (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Contudo, esses problemas podem ser contornados seguindo alguns critérios, como: seleção de *primers*, estabelecimento de concentrações ótimas dos reagentes, incluindo padronização do programa de PCR, e uma cuidadosa atenção ao selecionar fragmentos mais nítidos e facilmente interpretáveis como presentes ou

ausentes no momento da coleta dos resultados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; LACERDA, 2002).

Como consequência da característica dominante, não é possível estimar a frequência de um alelo particular em uma população, isto é a frequência alélica ou gênica. Porém, a estrutura genética de populações tem sido estudada através de métodos alternativos como: i) análise de variância molecular (AMOVA) ou ii) desvios na frequência alélica em relação ao esperado para populações em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (LYNCH e MILLIGAN, 1992). Entretanto, esta premissa pode não corresponder à realidade em muitas populações naturais, onde diferentes graus de endogamia ou auto-fecundação afastam a população do equilíbrio. Ainda assim, a característica dominante limita a quantidade de informação obtida por loco, quando comparada a marcadores co-dominantes (LACERDA, 2002).

2.5 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A Análise Molecular de Variância (AMOVA), desenvolvida por Excoffier et al. (1992) para análise de haplótipos de DNA mitocondrial foi adaptada por Stewart e Excoffier (1996) para analisar dados de RAPD, dispensando qualquer premissa ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta metodologia foi primeiramente utilizada por Huff et al., em 1993. Após este trabalho muitos autores utilizaram e vêm utilizando AMOVA para descrever a estrutura genética de populações naturais, como Bushakra et al. (1999); Cavallari et al. (2006); Esselman et al. (1999), Kheher et al. (2000), entre outros. Mostrando-se uma ferramenta importante para determinar a diversidade e estrutura genética, permitindo inclusive a determinação de índice análogo à estatística F de Wrigth (1951) denominada Φ_{ST} (STEWART e EXCOFFIER, 1996).

Tal abordagem é baseada em informações sobre a divergência de DNA de dados provenientes de haplótipos incorporadas a uma análise no formato de análise de variância, derivada da matriz de distância quadrada entre todos os pares de haplótipos. Estas refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. Desta forma, permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre populações (Φ_{ST}) (CAVALLARI et al., 2006).

3. CAPÍTULO 1

Diversidade Clonal em Populações de *Lymania azurea* (Bromeliaceae)

Detectada Através de Marcadores RAPD *

VANESSA DE CARVALHO CAYRES PAMPONÉT¹, TALITA FONTOURA ALVES¹,

RONAN XAVIER CORRÊA¹, FERNANDA AMATO GAIOTTO^{1,2}

1 – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz

2 – Autor correspondente: gaiotto@uesc.br

* Artigo a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Botânica

ABSTRACT

Clonal diversity in *Lymania azurea* (Bromeliaceae) Populations

Detected through RAPD markers

Lymania azurea is an endemic species from southern Bahia that occurs in secondary forest successions. It is an epiphyte with clonal habit that forms groups on trunks with 2 to 10 ramets. Each group constitutes a single individual, a genet. This species is threatened with extinction and, due to its restricted occurrence, can be destroyed by habitat loss. Clonal habit generally decreases the genetic variability of a population. However, according to the literature, it is possible to find genetic diversity similar to plants with sexual reproduction in clonal plants, including species from Bromeliaceae family. The objective of this study was to evaluate the described clonal habit for *Lymania azurea* species. Two populations divided in four subpopulations were analyzed, one in the town of Ilhéus-BA and three in the town of Una-BA. For genetic analysis, we sampled 3 ramets from 19 genets, totalizing 57 ramets in the four subpopulations. We selected 10 primers which generated 48 polymorphics bands. The Jaccard's genetic similarity index showed diversity within genets, therefore, genetic variability among clones (ramets). Nineteen genets were expected in dendrograms, but no was observed. So, among the genets expected, 42% revealed similarity from 0.8 to 1.0. In these cases, it can be suggested that somatic mutations are adding genetic variability among the clones. The other 58% genets presented very divergent pairs of ramets (from 0.2 to 0.8 of genetic similarity). The Molecular Analysis of Variance revealed 40% of diversity within genets, showing variability previously underestimated in plants with clonal habit. Further investigations, involving different areas of biology as ecology, plant anatomy, phenology,

reproductive biology, plant physiology and genetics, are needed in order to explain the genetic diversity found among clones.

Key-words: Population Genetics, Atlantic Forest and Conservation.

RESUMO

Diversidade Clonal em Populações de *Lymania azurea* (Bromeliaceae)

Detectada Através de Marcadores RAPD

Lymania azurea é uma espécie endêmica da região sul da Bahia, que habita o sub-bosque, sendo epífita e de crescimento clonal, formando grupos sobre os troncos que possuem de 2 a 10 *ramets*. Cada agrupamento constitui um único indivíduo, *genet*. Esta espécie encontra-se ameaçada de extinção e por ser de ocorrência restrita, pode ser dizimada por perda de habitat. O hábito clonal geralmente restringe a variabilidade genética de uma população. Entretanto, como relatado na literatura, é possível encontrar diversidade genética semelhante a plantas de reprodução sexuada entre plantas clonais, inclusive entre espécies da família Bromeliaceae. O objetivo deste trabalho foi avaliar o hábito clonal descrito para a espécie *Lymania azurea*. Foram analisadas duas populações divididas em quatro subpopulações, uma no município de Ilhéus-BA e três no município de Una-BA. Para a análise genética foram amostrados 3 *ramets* de 19 *genets*, totalizando 57 *ramets* em quatro subpopulações. Foram selecionados 10 *primers* que geraram 48 locos polimórficos. O índice de similaridade genética de Jaccard mostrou diversidade dentro do *genet*, ou seja, variabilidade genética entre clones (*ramets*) Eram esperados 19 *genets* no dendrograma, mas nenhum *genet* foi observado. De modo que entre os *genets* esperados, 42% revelaram similaridade de 0.8 à 1.0. Nestes casos pode-se sugerir que mutações somáticas estão adicionando variabilidade genética entre clones. Os demais 58% dos *genets* apresentaram pares de *ramets* muito divergentes (0.2 à 0.8 de similaridade genética). A análise molecular de variância revelou 40% de diversidade dentro de *genets*. Evidenciando uma variabilidade anteriormente subestimada pelo hábito clonal das plantas. São necessárias investigações mais aprofundadas envolvendo diferentes áreas da biologia

como ecologia, anatomia vegetal, fenologia, biologia reprodutiva, fisiologia vegetal e genética, a fim de explicar a diversidade genética encontrada entre clones.

Palavras-chave: Genética de Populações, Mata Atlântica e Conservação.

Introdução

Lymania azurea Leme, família Bromeliaceae, habita o sub-bosque, é endêmica da Mata Atlântica ao sul do estado da Bahia, apresenta distribuição muito restrita sendo encontrada apenas nos municípios de Una-BA, Ilhéus-BA e Buerarema. Encontra-se listada na categoria “em perigo” de extinção, pela Fundação Biodiversitas, que utiliza critérios da IUCN (*The World Conservation Union*) para classificar espécies ameaçadas. Assim como outras espécies do gênero, é epífita e de crescimento clonal, formando grupos sobre os troncos que possuem de 2 a 10 *ramets*. Cada agrupamento constitui um único indivíduo (Benzing, 2000).

A estratégia de crescimento clonal de uma espécie determina que um indivíduo geneticamente idêntico (*genet*) é formado por *ramets* que são ligados por um mesmo estolão. Os *ramets* se apresentam na forma de rosetas – perfilhos (com fenologia independente dos demais *ramets* do *genet*). De modo que a variação genética ocorre apenas entre *genets* (Cavallari, 2004).

Este modo de propagação em plantas favorece a captação de recursos e a colonização de novas áreas, resistindo bem a zonas impactadas. O hábito clonal pode conduzir a uma moderação na perda da diversidade genética, desde que *ramets* independentes possam reduzir a probabilidade da morte do *genet*.

Espécies clonais geralmente apresentam uma baixa participação de reprodução sexuada na formação das populações. Conforme Persson & Gustavsson (2001), a contribuição das sementes para a formação de populações é um evento raro em espécies com hábito clonal, portanto espera-se que tais espécies apresentem menos diversidade genética do que espécies com reprodução exclusivamente sexuada. Entretanto, alguns estudos revelaram níveis de

diversidade genética molecular em espécies clonais similares aos encontrados em espécies de reprodução sexuada (Fischer et al. 2000, Kreher et al. 2000).

Devido ao pouco tempo em que a espécie *L. azurea* foi descrita (Leme, 1987), pouco se conhece sobre sua biologia. Além disso, nenhum estudo populacional foi desenvolvido para compreender os níveis de variabilidade genética remanescente nas escassas populações de hábito clonal.

Para acessar a variabilidade genética de populações existem diversos marcadores moleculares que permitem analisar diretamente no genoma do organismo, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado.

Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) mostram-se como ferramentas úteis para a análise da diversidade genética molecular em populações naturais de plantas.

Este trabalho teve como objetivo utilizar marcadores RAPD para confirmar o hábito clonal descrito para a espécie *Lymania azurea*.

Material e Métodos

Amostragem biológica - Foram amostradas as duas populações conhecidas desta espécie nos municípios de Una-BA e Ilhéus-BA. E a amostragem foi dividida em subpopulações.

A população do município de Una-BA foi coletada na Reserva Biológica (Rebio-Una-BA) e dividida em três subpopulações (PRCP I, PRCP II e Piedade). A população do município de Ilhéus-BA foi amostrada uma subpopulação em fragmento de Mata Atlântica (no povoado de Sapucaeira, a 20 km de Ilhéus-BA) (Figura 1).

Assim, para fins de análise, neste trabalho as coletas foram estruturadas em nível de *genets*, foram amostrados três *ramets* por *genet*, totalizando 57 *ramets* em 19 *genet* (figura 2).

Extração de DNA - As extrações foram processadas com protocolo CTAB 2% (brometo de cetil-trimetil amônio) descrito por Doyle & Doyle (1990), com modificações Ferreira & Grattapaglia (1998) de modo que foi acrescentado mais um ciclo de emulsificação com 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

Reações RAPD - As reações para amplificação foram preparadas em um volume de 13 µl contendo: 20 mM de tampão 10x (NH₄)₂SO₄; 75 mM Tris-HCl 1,5 mM de MgCl₂; 2,5 mM dNTPs ; 9,2 µM *primer*; 10 mg/µl de BSA (*Bovine Serum Albumin*); 1 U de Taq polimerase ; 2,5 ng/µl de DNA e adicionado água Milli Q para completar o volume desejado. Em cada reação foi utilizado controle negativo (água Milli Q estéril no lugar do DNA molde).

A PCR foi realizado em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (*PerkinElmer*) utilizando o seguinte programa: 1 minuto a 92°C (desnaturaçãoinicial); 1 minuto a 92°C; 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C. Ao final dos 40 ciclos foi realizada extensão de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1,5% em TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) 1x. Foi usado como marcador de peso molecular o ladder 1Kb (*Fermentas Life Sciences*). A imagem do gel foi capturada sob luz ultravioleta pelo fotodocumentador EDAS 24.0 da KODAK.

Seleção de *primers* - Foram testados 143 *primers* RAPD escolhidos de maneira aleatória nos kits de A a Z da *Operon Technologies*. Os *primers* foram selecionados de acordo com a quantidade e qualidade de locos polimórficos amplificados, visando à facilidade na leitura dos dados e minimizando potenciais erros de interpretação. Assim, foram escolhidos 10 *primers* para realização das análises (Tabela 1). Dos fragmentos amplificados por estes *primers* foram selecionadas os mais robustos e facilmente interpretáveis para,

aproximadamente, 100% dos indivíduos, as quais foram classificadas como marcadores nota A.

Teste de quantidade de DNA por reação - A quantidade de DNA é um dos fatores fundamentais para o sucesso da reação de PCR, uma vez que poderá não ocorrer amplificação se a sua quantidade for excessivamente baixa ou alta.

Deste modo, foi realizado um experimento piloto para otimizar a concentração de DNA, uma vez que, seu excesso poderia resultar, ou na falha completa da reação devido à alta concentração de impurezas agregadas, ou a perfis eletroforéticos com arraste e fragmentos pouco definidos. Por outro lado, a baixa concentração do DNA resultaria em amplificação errônea ou não amplificação de certos fragmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Por ser desconhecida a complexidade do genoma em *Lymania sp.* e sabendo que o número de locos RAPD amplificados e visualizados na eletroforese depende exclusivamente do comprimento do *primer* utilizado e do tamanho e complexidade do genoma analisado (Ferreira & Grattapaglia, 1998).foi realizado testes de diferentes concentrações do DNA na reação, a fim de garantir o perfil eletroforético dos fragmentos obtidos, evitando a interpretação de polimorfismos causados por artefatos da reação por excesso ou falta de DNA.

Assim, foram testadas quantidades finais de DNA na reação em 7,5; 15; 30; 60 e 100 ng.

Teste de repetibilidade - Foi testada a reproducibilidade dos marcadores RAPD, através da repetição de reações de amplificação em três *primers* (OPF-13, OPP-04 e OPP-14), a fim de identificar os mesmos marcadores amplificados. As repetições foram realizadas em dias distintos, utilizando as mesmas amostras de DNA. Durante o teste de reproducibilidade foram

mantidas as condições de: concentração de reagentes, temperatura de anelamento e marca do termociclador usado. Este teste permitiu verificar a manutenção do perfil eletroforético, ou seja, manutenção do padrão de marcadores.

Análise estatística dos dados - Os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de marcadores, gerando uma matriz binária. O software NTSys (Rohlf, 2000), foi utilizado para gerar uma matriz de similaridade de Jaccard entre todos os *ramets* com base na matriz binária.

Os coeficientes de similaridade de Jaccard (S) obtidos nesta matriz permitiram detectar a presença de clones, sendo estes identificados através de $S=1$. O *software* NTSYS 2.1 (Rohlf, 2000), também permitiu o agrupamento aos pares de amostras pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method arithmetical means*), utilizando médias aritméticas das medidas de similaridade entre os genótipos considerados. Foi calculada a correlação cofenética de Mantel (r), entre a matriz de similaridade genética e o dendrograma. Tal estimativa foi baseada em 10.000 permutações.

Foi realizada Análise de Variância Molecular, utilizando os *softwares* AMOVA-PREP (MILLER, 1998) e AMOVA 1.55 (EXCOFFIER et al.,1992), para detectar a variância genética dentro de cada *genet*.

Resultados e Discussão

A espécie contemplada neste trabalho, presumivelmente, apresenta hábito clonal, distribuindo-se em estolões com várias rosetas. Desta forma, todas as rosetas (ou *ramets*) pertencentes ao mesmo estolão seriam, em teoria, geneticamente idênticas (compõe um *genet*). Cada *ramet* tem desenvolvimento e fenologia independentes dos demais *ramets* do

mesmo estolão, realizando funções ecológicas de indivíduo. Neste trabalho, porém, foram constatadas diferenças genéticas entre *ramets* de um mesmo clone, como já verificado em outras espécies. Tal informação baseada em dados genéticos de *Lymania azurea*, permitiu o levantamento de hipóteses que possam explicar tal resultado biológico.

Extração de DNA e seleção de marcadores - O DNA apresentou-se íntegro e puro, não havendo traços de degradação nem contaminação com proteínas, que constituem fatores de risco para uma reação de amplificação completa e reproduzível.

Entre os 10 *primers* selecionados, foram elencados 48 locos classificados por nota A, ou seja, que apresentavam fragmentos nítidos e facilmente interpretáveis em aproximadamente todos os indivíduos analisados (tabela 1).

Teste de quantidade de DNA por reação - Mesmo desconhecendo o tamanho do genoma de *Lymania azurea* foi possível definir uma concentração ótima de DNA para as reações de RAPD. Entre as diferentes concentrações de DNA testadas na reação, pôde-se concluir que entre a mínima concentração de 7,5 ng e máxima de 100 ng, não ocorreram variações nos perfis dos fragmentos amplificados, ou seja, os perfis eletroforéticos foram reproduzíveis, mantendo o mesmo padrão de amplificação em todas as concentrações de DNA testadas (Figura 3). Portanto foi utilizado, como padrão, a menor concentração de DNA (7,5 ng) para uso nas reações realizadas no presente trabalho.

Teste de repetibilidade - A baixa repetibilidade de alguns marcadores é frequentemente citado na literatura como uma das principais limitações da técnica RAPD. Contudo, possivelmente contornada ao estabelecer alguns critérios, como: concentração de reagentes, temperatura de anelamento e termociclador usado (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para contornar este problema do marcador, foi feita análise bastante criteriosa dos dados, selecionando os marcadores mais nítidos e eliminando fragmentos que geram ambigüidade, uma vez que estes podem ser resultantes de: (i) baixo poder de um *primer* específico em discriminar entre sítios de amplificação distintos; (ii) competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima e (iii) problemas com padronização das condições de amplificação (Ferreira & Grattapaglia, 1998).Esses fatores associados podem favorecer a não reproducibilidade de alguns fragmentos.

Neste trabalho a repetibilidade dos marcadores selecionados pode ser assegurada já que foram realizados testes realizados em dias distintos, onde foram mantidas as mesmas condições de amplificação, estes apresentaram semelhantes perfis eletroforéticos e permitiram observar com clareza os mesmos marcadores selecionados (Figura 4).

Análise de diversidade entre *ramets* – Era esperada no dendrograma (figura 5) a formação de 19 agrupamentos com similaridade total ($S=1$). Contudo, este resultado não foi obtido. Logo, as similaridades genéticas, estimadas a partir do índice de similaridade de Jaccard, permitiram constatar variabilidade genética molecular dentro do *genet*, ou seja, entre *ramets* de um mesmo clone (Figura 5). Pode ser verificado nos trabalhos realizados por Ayres & Ryan (1999), Esselman et al. (1999), Bushakra et al. (1999), Bush & Mulcahy (1999), Fisher et al. (2000), Kreher et al. (2000), Persson & Gustavsson (2001), Cavallari et al. (2006) a existência de diversidade entre clones e estes interpretados como sendo resultantes de recombinação genética, uma vez que algumas dessas plantas são gramíneas e espécies de bromélias que formam touceiras sendo, portanto, de difícil identificação dos perfilhos no campo. Assim tais autores acreditam na ocorrência de produto de reprodução sexuada associada aos produtos de crescimento clonal.

Por sua vez, os clones em *Lymania azurea* são facilmente identificados, devido à estrutura da planta, que é conectada por um único estolão (Figura 6). Assim, com base na amostragem e devido à morfologia da planta, foi possível definir o número esperado de *genets* na análise.

O valor estimado para a correlação cofenética de Mantel (r) foi de 0,899, o que indica elevada correlação positiva entre a matriz de similaridade genética e o dendrograma apresentado na Figura 5.

Dentro dos 19 *genets* amostrados, 42% formaram grupos com similaridade acima de 0.8 e os demais 58% apresentaram similaridade genética entre 0.2 e 0.8.

A AMOVA, que abordou as variâncias das distâncias genéticas dentro do *genet*, detectou 40% de variância molecular, confirmando assim, a informação gerada pelo coeficiente de Jaccard.

O elevado número de diferentes genótipos é contrastante com a aparentemente reduzida participação da reprodução sexuada na formação de populações. Em *L. azurea* foram observadas, na ocasião da coleta, pouca floração ou frutificação nas populações. Não tendo sido observado nenhum *ramet* solitário nas populações coletadas.

Estudos com plantas clonais relatam pequena participação da reprodução sexuada para formação das populações e um grande número de diferentes genótipos. Persson & Gustavsson (2001), relatam que não se observa o estabelecimento de plântulas em populações de *Vaccinium vitis-idaea*, uma Ericaceae de hábito clonal. Esselman et al. (1999) relatam que a ocasional floração, alta taxa de aborto de embriões e a baixa taxa de germinação de sementes em *Calamagrostis posterii* (Poaceae), contribuem para que a reprodução sexuada seja um evento raro na espécie de hábito clonal.

A fim de explicar a variabilidade genética encontrada citada acima, os respectivos autores levantaram três hipóteses: (i) a reprodução sexual ocasional gera novos genótipos que

são mantidos e propagados vegetativamente. Assim ao longo de muitos anos, muitos genótipos diferentes se acumulam na população; (ii) no passado a reprodução sexual teria sido mais freqüente e estes genótipos estariam presentes na população até hoje devido à propagação vegetativa, e por fim, (iii) podem ocorrer mutações somáticas.

Sharma (2001) sugere ainda que a seleção diferencial em ambientes muito heterogêneos pode levar a diferentes genótipos em populações de plantas clonais.

Dentre estas hipóteses apenas a mutação somática e seleção diferencial parecem ser aplicáveis a *Lymania azurea*. Os clones nesta espécie são facilmente identificados, diferentemente de muitas das espécies citadas, que apresentam densos agrupamentos, rejeitando a possibilidade de que dentro do *genet* ocorra alguma roseta oriunda de reprodução sexual. Entretanto, é sabido que mutações somáticas são eventos raros e, portanto, conferem pouca diversidade no genoma total do indivíduo.

Este trabalho gera uma intrigante pergunta sobre a biologia reprodutiva em plantas de hábito clonal que só poderá ser aprofundada através de trabalhos futuros envolvendo diferentes áreas da biologia como ecologia, anatomia vegetal, fenologia, biologia reprodutiva, fisiologia vegetal e genética.

Agradecimentos - Este trabalho foi parte da dissertação de mestrado de V. C. C. PAMPONÉT desenvolvido na Universidade Estadual de Santa Cruz/ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular com bolsa do CNPq e financiado pela Fundação Biodiversitas e FAPESB. Os autores agradecem a ajuda dos colegas Maria S. Cunha e Felipe J. E. Marinho, nas coletas de campo. E à Claudine Gonçalves de Oliveira no laboratório.

Referências bibliográficas

- AYRES, D. R., RYAN, F. J. 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. *American Journal of Botany* 86: 344-353.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 690 p.
- BUSH S. P. & Mulcahy D. L. 1999. The effects of regeneration by fragmentation upon clonal diversity in the tropical Forest shrub *Poikilacanthus macranthus*: random amplified polymorphic DNA (RAPD) results. *Molecular Ecology* 8: 865-870.
- BUSHAKRA, J. M., HODGES S.A., COOPER J. B. & KASKA, D. D. 1999. The extent of clonality and genetic diversity in the Santa Cruz Island ironwood, *Lyonothammus floribundus*. *Molecular Ecology*. 8: 471-475.
- CAVALLARI, M. M. 2004. Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. Dissertação de Mestrado. São Paulo: ESALQ/USP.
- CAVALLARI, M. M., FORZZA, R.C., VEASEY, E. A., ZUCCHI, M. I. & OLIVEIRA, G. C. X. 2006. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation* 15: 4357-4373.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*. 12: 13-15.
- ESSELMAN, E. J., JIANQIANG, L., CRAWFORD, D. J., WINDUS J. L. & WOLFE A. D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porter* ssp. *Inesperata* (Poaceae):

- comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443-451.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes – application to human mitochondrial – DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª Ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEM, 220 p.
- FISCHER, M., HUSI, R., PRATI, D., PEINTINGER, M., KLEUNEN, M. V. & SCHMID, B. 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*. v.87, p.1128-1137.
- KREHER S. A., FORÉ S.A. & COLLINS B.S. 2000. Genetic variation within and among patches of the clonal species *Vaccinium stamineum* L. *Molecular Ecology* 9: 1247-1252.
- LEME, E. M. C. 1987. Novas Bromélias nativas do Brasil. *Bradea* 4: 392-404.
- MILLER, M. P. AMOVA-PREP. Department of Biological Sciences – Box 5640 Northern Arizona University Flagstaff, AZ 86011-5640 – mpm2@nauvax.ucc.nau.edu, 1998.
- PERSSON, H. A. & GUSTAVSSON B. A. 2001. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Molecular Ecology* 10: 1385-1397.
- ROHLF, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, Setauket, NY.
- SHARMA, I. K. 2001. Understanding clonal diversity patterns through allozyme polymorphism in an endangered and geographically restricted Australian shrub, *Lieria baeuerlenii*, and its implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 681-695.

Tabela1. *Primers* utilizados e respectivas seqüências, números de marcadores e tamanhos dos fragmentos analisados em *L. azurea*.

<i>Lymania azurea</i>			
<i>Primer</i>	Nº de marcadores polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)	Seqüência 5' – 3'
OPA-02	5	400-1500	TGCCGAGCTG
OPA-12	5	300-1480	TCGGCGATAG
OPF-13	5	450-1000	GGCTGCAGAA
OPJ-11	5	400-1450	ACTCCTGCGA
OPP-01	6	300-1500	GTAGCACTCC
OPP-04	4	300-1000	GTGTCTCAGG
OPP-13	3	800-1480	GGAGTGCCTC
OPP-14	4	200-900	CCAGCCGAAC
OPV-15	5	400-1500	CAGTGCCGGT
OPW-12	6	260-1500	TGGGCAGAAG

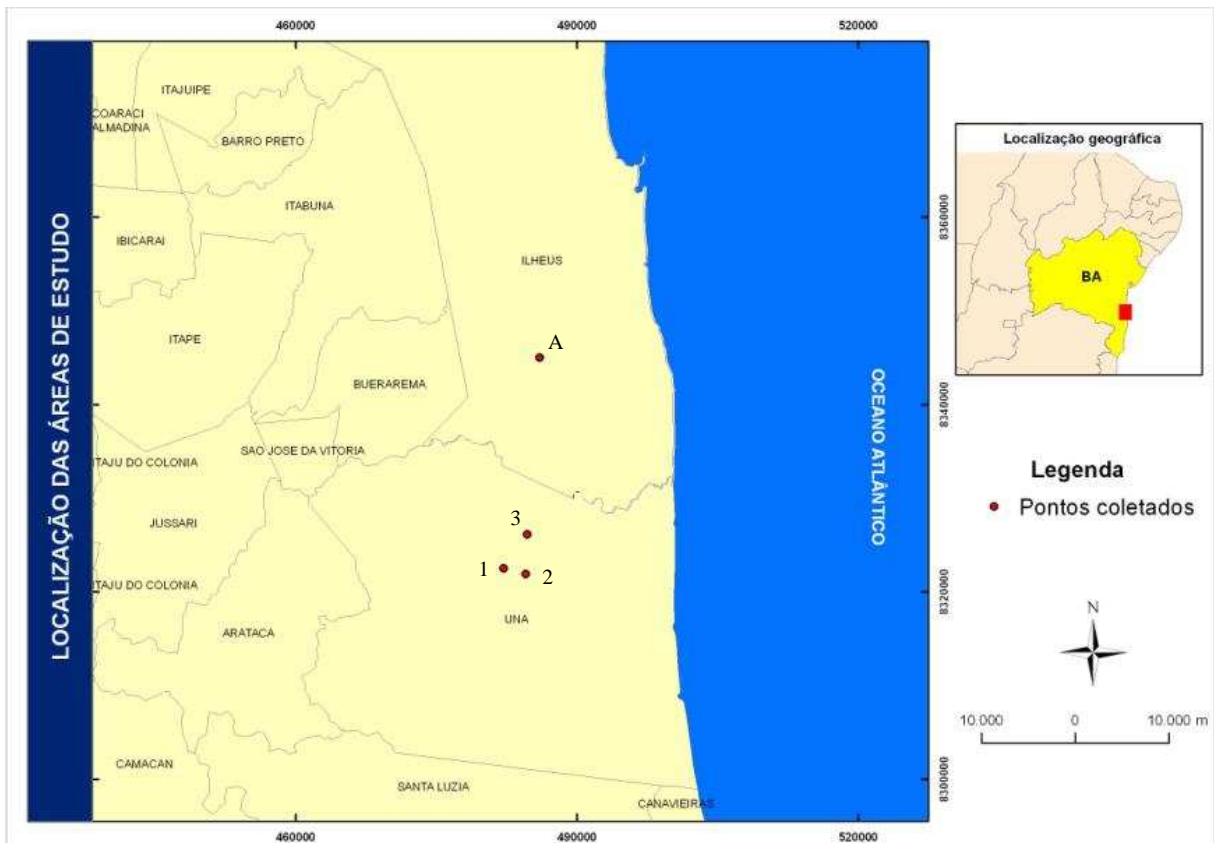


Figura 1. Mapa demonstrando a localização das subpopulações amostradas de *Lymania azurea*. A – Sapucaieira (Ilhéus-BA); 1, 2 e 3 - PRCP I, PRCP II e Piedade, respectivamente (Una -BA).

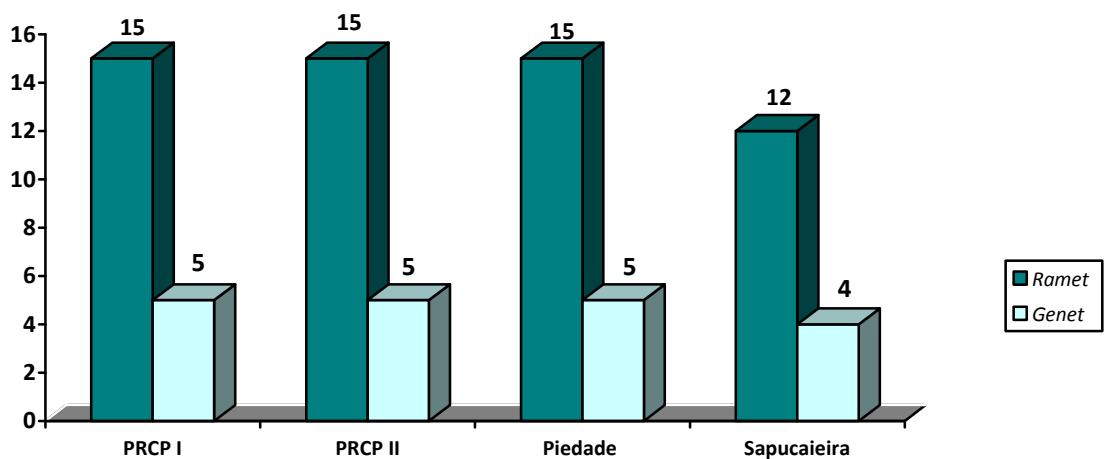


Figura 2. Subpopulações do PRCP I, PRCP II e Piedade (População de Una-BA) e subpopulação de Sapucaieira (População de Ilhéus-BA).

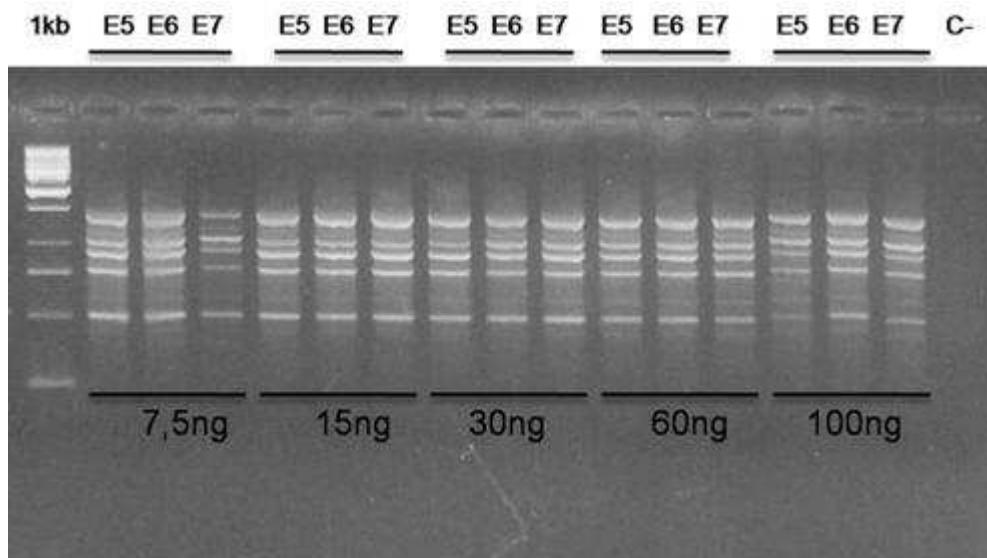


Figura 3. Teste de quantidade de DNA na reação, com *primer* OPF13, testados nas amostras E5, E6 e E7 em *L. azurea*. Submetendo estes a concentrações de 7,5; 15; 30; 60 e 100 ng.

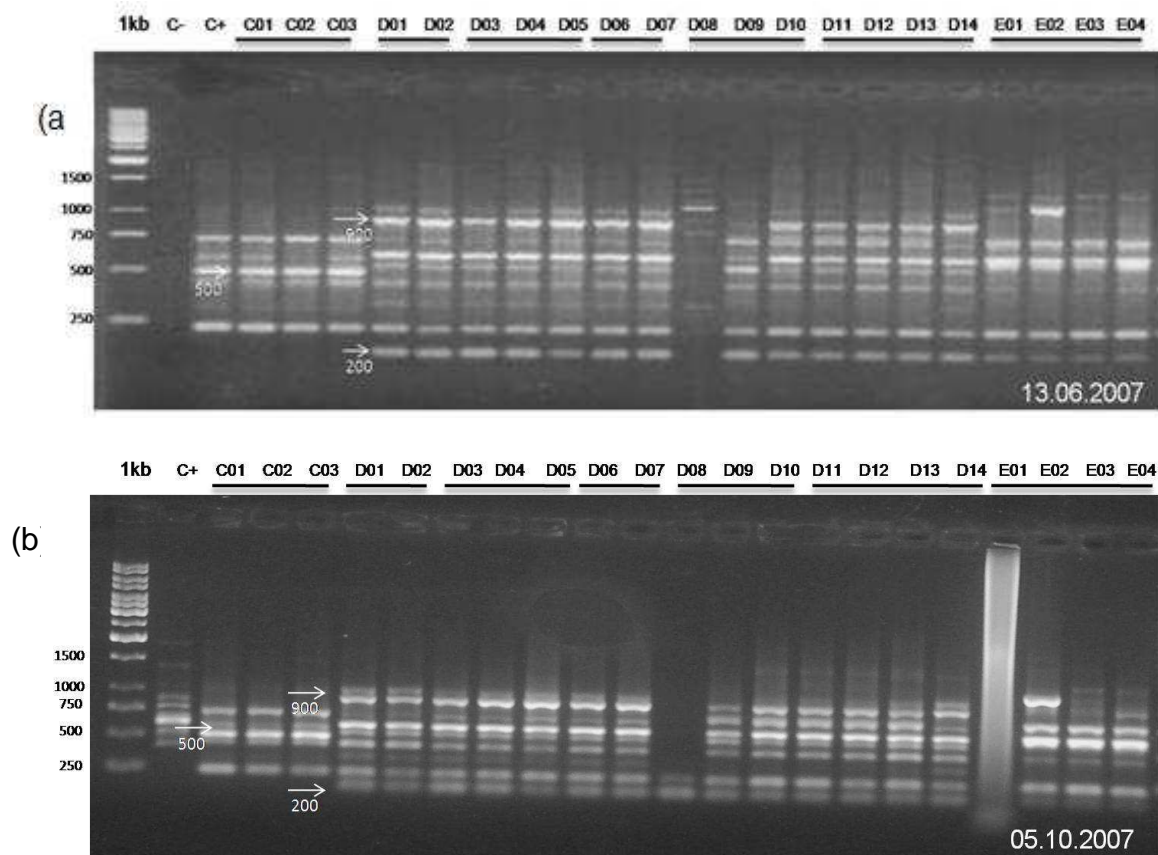


Figura 4. Teste de repetibilidade realizado com o *primer* OPP-14 e mesmas amostras de DNA. Em (a) PCR realizada em 13.06.2007 e em (b) PCR realizada em 05/10/2007. As setas indicam bandas analisadas.

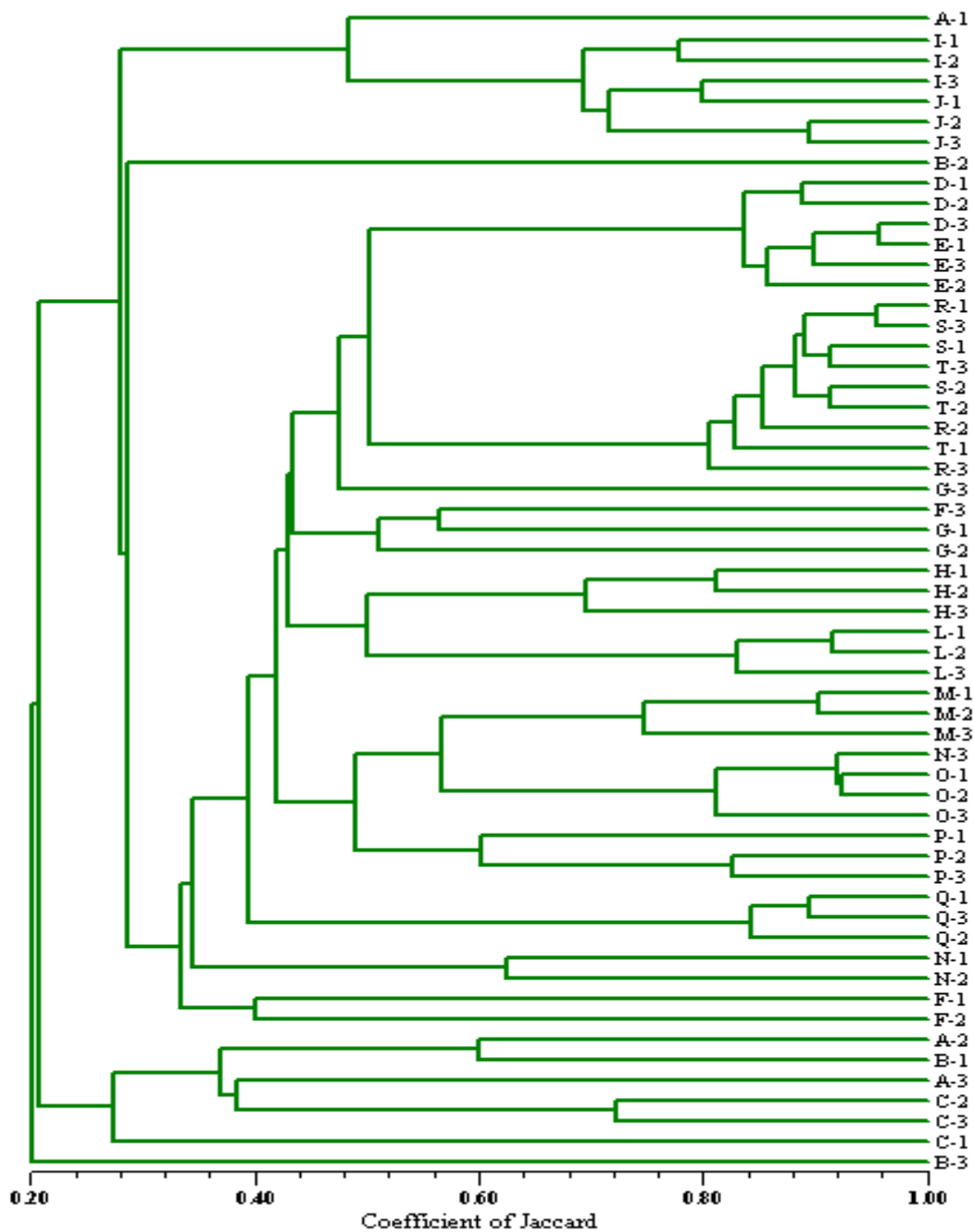


Figura 5. Dendrograma de similaridade genética dentro de *genets* de *L. azurea* (denominados por letras de A à T) e entre os *ramets* de cada *genet* (especificados por números de 1 à 3) definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas similaridades genéticas de Jaccard.



Figura 6. Plantas clonais. É observado nas fotos (a) e (b), um *genet* formado por três *ramets*, conectados por um estolão (setas).

4. CAPÍTULO 2

Diversidade genética em populações endêmicas de *Lymania* sp (Bromeliaceae): Implicações para a conservação

Vanessa de Carvalho Cayres Pamponét, Talita Fontoura Alves, Ronan Corrêa Xavier e Fernanda Amato Gaiotto

Resumo

A diversidade genética é de suma importância para o potencial evolutivo de uma espécie, e conhecê-la contribui para gerar dados no delineamento de estratégias de conservação em espécies ameaçadas. Foi estudada a diversidade genética em populações de *Lymania azurea*, espécie de distribuição muito restrita, que está listada na categoria “em perigo” de extinção pela Fundação Biodiversitas, devido a perda de habitat. Análise comparativa foi realizada com populações de *L. smithii*, de distribuição mais ampla do gênero. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi: (i) comparar a diversidade e estrutura genética entre ambas as espécies; (ii) analisar as populações de *L. azurea* em áreas antropizadas (Ilhéus-BA) e conservadas (Rebio-Una-BA) e (iii) gerar dados que possam ser utilizados para subsidiar programas de conservação. Duas populações de *L. azurea* foram amostradas, uma no município de Una-BA e, outra em Ilhéus-BA. *L. smithii* foi amostrada apenas em Una-BA. As áreas de coleta foram divididas em subpopulações: três em Una-BA (PRCPI, II e Piedade) e uma em Ilhéus-BA (Sapucaeira). O acesso a variabilidade genética foi realizado por 48 locos RAPD. A similaridade genética de Jaccard revelou maior diversidade em *L. smithii*. A AMOVA detectou maior variância dentro de populações. *L. azurea* revelou 20% de endogamia devido à subdivisão, enquanto, *L. smithii*, apresentou 10%. Analisando pares de subpopulações em *L. azurea*, menor índice de estruturação ($\Phi_{ST} = 0,098$), foi encontrado no par dentro da reserva, devendo ocorrer a possibilidade de fluxo gênico. Quando comparada as subpopulações em áreas antropizadas foram consideradas ($\Phi_{ST} = 0,372$). Assim, conclui-se que as fragmentações dos habitats estão interferindo no fluxo gênico entre populações, causando processos de deriva genética e redução da variabilidade. Logo, estratégias de conservação *ex situ*, e *in situ* são viáveis e fundamentais em *L. azurea*.

Palavras-chave: Epífita, RAPD, Mata Atlântica e Estrutura Genética.

1. Introdução

O gênero *Lymania*, da família Bromeliaceae, foi descrito por Read (1984). Espécies do gênero são ainda pouco conhecidas e, em sua grande maioria, apresentam distribuição restrita, sendo endêmicas da Mata Atlântica sul baiana. São epífitas, de crescimento clonal e formam grupos de 2 a 10 rosetas sobre os troncos (DE SOUSA, 2004). Duas espécies do gênero foram estudadas no presente trabalho: *Lymania azurea* Leme e *Lymania smithii* Read.

Lymania azurea encontra-se listada na categoria “em perigo” de extinção pela Fundação Biodiversitas e pode ser dizimada por perda de habitat. Esta espécie tem ocorrência muito restrita, com registros nos municípios de Una-BA, Ilhéus-BA e Buerarema. *L. smithii* possui distribuição mais ampla do gênero, ocorrendo em simpatria, no município de Una-BA, com *L. azurea*, com a qual compartilham algumas semelhanças morfológicas.

Conhecer a diversidade genética de uma espécie de maior distribuição e comparar com uma espécie de distribuição restrita, do mesmo gênero, onde ambas sofreram recente destruição extensiva do habitat, é importante para poder fornecer evidências das causas que resultaram em padrões evolutivos diferentes.

Além da ausência de estudos sobre a biologia de espécies do gênero *Lymania*, nenhum estudo foi até hoje desenvolvido sobre a variabilidade genética populacional.

Os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos na área de genética de populações, com diversas aplicações em estudos evolutivos, permitindo avaliar a diversidade genética diretamente ao nível de DNA, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado.

Assim, a diversidade genética pode ser acessada por marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ferramenta importante para espécies pouco estudadas, uma vez que não é necessário o conhecimento prévio de seqüências-alvo do DNA e por utilizar *primers* que anelam arbitrariamente no genoma, além de serem obtidos rapidamente a custos relativamente baixos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). As limitações da técnica são referentes ao caráter dominante dos marcadores, que não geram dados sobre as freqüências alélicas e a baixa repetibilidade dos marcadores também é questionada, porém ao

utilizar os devidos critérios metodológicos é possível gerar marcadores reproduzíveis, com dados sobre a verdadeira história evolutiva da espécie estudada.

Os conhecimentos gerados acerca da variabilidade genética nas populações é o tópico central da genética da conservação e pode ser utilizado para auxiliar na definição de unidades de conservação, indicando áreas e populações de maior ou menor importância para a preservação do táxon em questão, permitindo o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação. A genética aplicada à biologia da conservação ajuda também no diagnóstico do status de conservação de várias espécies (SANTOS e REDONDO, 2003).

Populações com alta variabilidade genética apresentam maior adaptabilidade às mudanças ambientais. Espécies que tiveram populações reduzidas têm, em geral, menor variabilidade genética, tornando-se mais vulneráveis à extinção quando as condições do ambiente se alteram (FRANKHAM et al., 2002). Assim, estratégias de conservação são freqüentemente dirigidas à proteção de espécies que se encontram ameaçadas de extinção.

A compreensão dos padrões de distribuição da diversidade genética e o nível de diferenciação intra-específico são de fundamental importância para a definição de estratégias de conservação e uso sustentado desses recursos genéticos (GRIBEL, 2001).

Tendo em vista as assertivas acima, este trabalho teve o objetivo de avaliar a diversidade genética populacional de *L. azurea* e *L. smithii* a fim de gerar dados que possam ser utilizados futuramente para subsidiar estratégias de conservação.

2. Material e Métodos

2.1 Critérios gerais de amostragem

A amostragem foi estruturada de modo a analisar a diversidade genética em duas espécies do gênero *Lymania*, considerando a diversidade entre *ramets*, já que estudos prévios revelaram níveis de diversidade genética molecular em *ramets* desta espécie (PAMPONÉT, 2008).

A coleta foi feita com o auxílio de um estilete e retiradas amostras de folhas de cada *ramet*. Estas foram imediatamente acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e permaneceram a 4°C até o momento da extração.

2.1.1 Amostragem de *Lymania azurea*

A amostragem abrangeu duas populações divididas em quatro subpopulações. Uma população foi coletada na Reserva Biológica de Una-BA (Rebio-Una-BA) sendo amostradas três subpopulações (PRCP I, PRCP II e Piedade). De modo que, PRCP I e Piedade, ocorrem no interior da reserva, dentro de um fragmento contínuo de mata e PRCP II, ocorre em área de borda da reserva, vulnerável à ação antrópica.

A segunda população foi coletada no município de Ilhéus-BA, com uma subpopulação amostrada, no povoado de Sapucaeira a 20 km de Ilhéus-BA. Ocorrendo em fragmento descontínuo de Mata Atlântica, em área muito impactada e vulnerável a ações antrópicas, como: derrubada de árvores, queimadas, retirada descontrolada de plantas de valor ornamental, entre outros.

Assim, neste trabalho foram amostrados no total 101 *ramets* de *L. azurea*, a saber: PRCP I (22), PRCP II (29), Piedade (33), Sapucaeira (17).

Uma vez que *L. azurea* está sob ameaça de extinção e tem ocorrência muito restrita, o número amostral levantado corresponde a toda representatividade conhecida da espécie, nos municípios de Una-BA e Ilhéus-BA, ou seja, todos os indivíduos conhecidos nestas populações foram amostrados.

2.1.2 Amostragem de *Lymania smithii*

O objetivo de analisar a diversidade genética em *L. smithii*, surgiu ao observar em campo a maior distribuição da mesma em relação à distribuição de *L. azurea*. Sabendo que se trata de espécies simpátricas, conhecer e comparar a variação genética em ambas é importante para auxiliar a compreensão da atual situação de ameaça em *L. azurea*.

De acordo com a proposta do trabalho de comparar níveis de diversidade entre as espécies, a amostragem de *L. smithii* foi menor e se restringiu aos pontos de coleta iguais aos de *L. azurea*. Assim, selecionaram-se apenas duas subpopulações da população de Una-BA, (Rebio-Una-BA) para a amostragem de *L. smithii*.

Assim, foram amostrados no total 43 *ramets* de *L. smithii*, a saber: PRCP I (17) e PRCP II (17).

2.2 Análise RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

2.2.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990) e adaptações de Ferreira & Grattapaglia(1998), utilizando o tampão CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio). As amostras foram submetidas a duas fases de emulsificação com 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

A quantificação da concentração do DNA extraído de cada amostra foi realizada por análise comparativa com DNA padrão de concentração conhecida (DNA de fago λ 10, 50 e 100 ng/µl).

Após a quantificação, todas as amostras foram diluídas para 2,5 ng/µl em água Milli Q autoclavada.

2.2.2 Reações de PCR

As reações para amplificação foram preparadas em um volume de 13 µl contendo: 20 mM de tampão 10x (NH₄)₂SO₄; 75 mM Tris-HCl 1,5 mM de MgCl₂; 2,5 mM dNTPs ; 9,2 µM *primer*; 10 mg/µl de BSA (*Bovine Serum Albumin*); 1 U de Taq polimerase ; 2,5 ng/µl de DNA e adicionado água Milli Q para completar o volume desejado.

Para cada placa de reação foi acrescentado controle negativo, substituindo a amostra de DNA por água Milli Q estéril.

As reações foram processadas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (*PerkinElmer*) e submetidas ao seguinte programa: desnaturação inicial a 92°C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C. Ao final foi realizada extensão de 5 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1,5% a uma voltagem de 110 v por 3 horas. Como marcador de peso molecular foi usado ladder 1Kb (*Fermentas Life Sciences*). As imagens dos géis foram capturada sob luz ultravioleta pelo fotodocumentador EDAS 24.0 da KODAK.

2.2.3 Seleção de *primers*

Foram testados 143 *primers* RAPD escolhidos de maneira aleatória nos kits de A a Z da *Operon Technologies*. A verificação do perfil de amplificação de cada *primer* foi realizada com quatro amostras distintas de *L. azurea*. Os *primers* foram selecionados de acordo com a quantidade e qualidade de marcadores polimórficos apresentados. Visando a facilidade de serem interpretadas como presentes ou ausentes em todos os indivíduos, a fim de minimizar potenciais erros de interpretação no registro de dados, buscaram-se utilizar os mesmos *primers* selecionados para as duas espécies.

2.2.4 Classificação de marcadores

Os marcadores selecionados para leitura dos dados binários nas duas espécies simultaneamente foram classificados em três categorias: A – Marcadores com fragmentos facilmente interpretáveis para, aproximadamente, 100% dos indivíduos; B - Marcadores com fragmentos facilmente interpretáveis para, aproximadamente, 75% dos indivíduos e C – Marcadores com fragmentos facilmente interpretáveis para, aproximadamente, 50% dos indivíduos e os outros 50%, a presença ou ausência do fragmento era duvidosa.

Deste modo, visando maior acurácia das informações geradas pelos marcadores RAPD, foram considerados neste trabalho apenas os marcadores da categoria A.

2.3 Análise estatística dos dados

A partir da leitura dos géis, os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de marcadores, gerando uma matriz binária. O programa computacional NTSys 2.1 (ROHLF, 2000), foi utilizado para gerar a matriz de similaridade de Jaccard entre todos os pares de *ramets* com base na matriz binária.

Os dados da matriz de similaridade foram agrupados pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method arithmetical means*), método aglomerativo que agrupa pares mais similares, logo revela quais são mais distantes gerando um

dendrograma. Foi calculada a correlação cofenética de Mantel (r), entre a matriz de similaridade genética e o dendrograma, a confiabilidade do “ r ” foi baseada em 10.000 permutações. Para a obtenção destas análises foi utilizado o *software* NTSys 2.1. A confiabilidade dos nós do dendrograma construído, para as quatro subpopulações analisadas, foi baseado em 10.000 *bootstraps*. A análise de agrupamento foi realizada com o auxílio do programa Bood-P (COELHO, 2003).

Foram construídas matrizes de similaridade para cada espécie separadamente e, para as duas espécies simultaneamente.

Uma análise análoga à estrutura genética de populações foi realizada através de Análise de Variância Molecular, com o auxílio dos programas AMOVA-PREP (MILLER, 1998) e AMOVA 1.55 (EXCOFFIER et al., 1992). Esta análise é baseada em dados de distância euclideana. A análise de variância é feita sobre os dados de distância gerando um parâmetro chamado Φ_{ST} , análogo ao F_{ST} de Wright (1951).

Assim avaliou-se a partição da variância genética molecular, para cada espécie estudada, nos seguintes níveis: inter-populacional e intra e inter-subpopulacional.

3. Resultados e Discussão

Atualmente, o conhecimento da diversidade genética de populações é entendido como etapa fundamental para subsidiar programas conservacionistas. Neste trabalho foi analisada, pela primeira vez, a diversidade genética em duas espécies, endêmicas da Mata Atlântica sul baiana. A espécie *Lymania azurea*, que está ameaçada de extinção e vulnerável a sofrer grandes perdas nos próximos anos. Esta foi analisada quanto à diversidade genética e comparada com a de *Lymania smithii*, que por sua vez tem ampla distribuição. As análises permitiram: comparar níveis de diversidade e estrutura genética entre as espécies, definindo que populações de *Lymania azurea* em unidades de conservação mantêm índices semelhantes aos de *Lymania smithii*; e geraram informações genéticas importantes para definir estratégias para a conservação, indicando áreas importantes para conservação *ex situ* e *in situ* da espécie.

3.1 Análise RAPD

3.1.1 Seleção de *primers*

Entre 143 *primers* testados, 52 mostraram-se adequados, produzindo fragmentos nítidos com boa intensidade. Entre estes, 14 foram utilizados nas reações de PCR, por gerarem mais fragmentos e apresentarem melhor perfil de amplificação.

Esta seleção prévia foi importante, pois permitiu a escolha de *primers* mais informativos para prosseguir as análises com um grande número de indivíduos e poucos *primers*, reduzindo os custos e o tempo no laboratório para gerar uma quantidade de marcadores considerada satisfatória para o tipo de análise aqui realizada. Com este simples experimento piloto foi possível escolher apenas os *primers* que apresentaram, de fato, melhor padrão de amplificação e maior número de locos, maximizando a relação custo-benefício.

3.1.2 Classificação de marcadores

3.1.2.1 *L. azurea*

Entre os 14 *primers* utilizados para a PCR, foram selecionados 65 marcadores polimórficos classificados em três categorias (A, B e C). Contudo, para garantir o maior número de marcadores facilmente interpretáveis e reproduzíveis, foram analisados apenas os marcadores da categoria A (definido por marcadores com fragmentos facilmente interpretáveis para, aproximadamente, 100% dos indivíduos). Assim, para leitura dos dados binários foram utilizados 48 marcadores, gerados de 10 *primers*. Na figura 1, pode-se observar o perfil de amplificação do *primer* OPF-13.

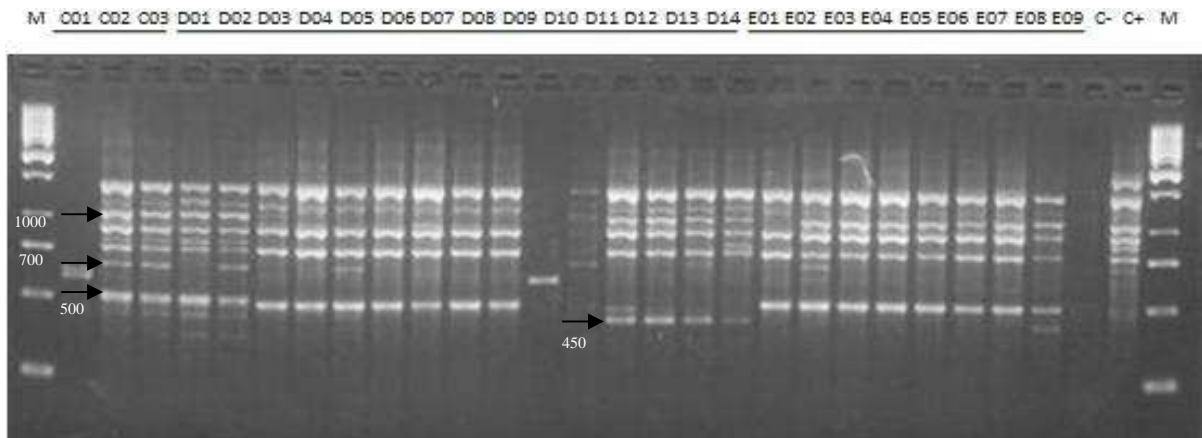


Figura 1 – Padrão de fragmentos RAPD, amplificadas com o *primer* OPF-13, em amostras de *L. azurea*. Evidenciando quatro fragmentos selecionados de peso molecular 450, 500, 700 e 1000 pb. M – marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas) e C – controle negativo.

3.1.2.2 *L. smithii*

Foram utilizados 12 *primers* para análise em *L. smithii* que geraram 48 marcadores. Na tabela 1, estão relacionados os *primers* e os respectivos números de locos selecionados em ambas as espécies estudadas.

Tabela 1 – *Primers* utilizados em *L. azurea* e *L. smith* e seus respectivos números de locos totais amplificados, locos monomórficos, locos analisados e tamanhos dos fragmentos selecionados.

Espécie	Primer	Locos totais	Locos monomórficos	Locos polimórficos analisados	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>Lymania azurea</i>	OPA-02	11	0	05	400-1500
	OPA-12	12	0	05	300-1480
	OPF-13	09	3	05	450-1000
	OPJ-11	07	1	05	400-1450
	OPP-01	12	0	06	300-1500
	OPP-04	09	1	04	300-1000
	OPP-13	09	1	03	800-1480
	OPP-14	11	1	04	200-900
	OPV-15	12	0	05	400-1500
	OPW-12	09	1	06	260-1500
<i>Lymania smithii</i>	OPA-02	11	0	3	400-1500
	OPA-08	05	2	2	300-600
	OPA-12	10	0	4	300-1480
	OPF-13	08	2	5	450-1000
	OPG-18	12	2	3	550-1500
	OPJ-11	10	2	5	400-1450
	OPP-01	10	0	6	300-1500
	OPP-04	10	1	4	300-1000
	OPP-12	12	2	3	400-600
	OPP-13	14	1	3	800-1480
	OPP-14	13	2	4	200-900
	OPV-15	15	1	6	250-1500

No capítulo 1 desta dissertação Pamponét (2008) testou a repetibilidade de alguns marcadores selecionados e otimizou a quantidade de DNA a ser usado nas reações para a espécie *Lymania azurea*. Este teste garantiu a eficácia da técnica e demonstraram que através dos critérios metodológicos empregados foi possível contornar algumas limitações atribuídas aos marcadores RAPD, como descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998).

3.2 Diversidade e Estrutura Genética

3.2.1 *L. azurea*

O índice de similaridade de Jaccard, obtido para espécie *L. azurea*, variou entre 0,2 e 1,0, permitindo observar pelo dendrograma, a formação de grupos geneticamente distintos, intra e inter-subpopulacional (Figura 2). A formação de agrupamentos separando populações caracteriza uma diversidade genética estruturada, resultante provavelmente de baixo fluxo gênico entre as subpopulações.

Contudo, foi observado nas subpopulações PRCP I e Piedade, localizadas dentro Rebio, melhor distribuição no dendrograma. Logo, estas subpopulações que ocorrem em áreas preservadas, demonstraram melhores níveis de diversidade, devendo ocorrer meios de conectividade que permitam o fluxo gênico. Em plantas a transferência de genes pode ocorrer tanto pelo movimento de organismos individuais (sementes, rizomas, estolões), como, pelo movimento de gametas (pólen) (ZUCCHI, 2002). Vale ressaltar que a ocorrência de fluxo gênico poderia ser confirmada através da utilização de marcadores microssatélites, como observada nos trabalhos de Dick et al. (2007) e Gaiotto et al. (2003).

Em contrapartida, a subpopulação PRCP II (coletada em área de borda da Rebio) e a subpopulação de Ilhéus-BA (Sapucaieira) mantiveram uma distância genética em torno de 40% (Figura 2). A distância genética encontrada deduz que há baixa diversidade podendo ser decorrente de processos de deriva genética e aumento da endogamia, conseqüentes da perda de hábitat e fragmentação nos remanescentes florestais.

Os índices de similaridade genética obtidos entre as subpopulações analisadas culminando no agrupamento das subpopulações Sapucaieira e PRCP II (Figura 3) revelam que as ações antrópicas em áreas desprotegidas e área de borda, provavelmente causam uma mudança aleatória na freqüência gênica pela deriva genética e conseqüente aumento da endogamia.

O índice de correlação cofenética de Mantel (r), entre a matriz de similaridade genética e o dendrograma, foi de 0,878 o que revela forte correlação positiva entre a real similaridade encontrada na matriz de Jaccard e a similaridade média vista no dendrograma.

Cavallari et al. (2006) ao analisar três espécies de *Encholirium* (Bromeliaceae), constatou através da similaridade de Jaccard, que *E. subsecundum*, a espécie mais amplamente distribuída, com mais populações e com maior número de indivíduos amostrados foi a que apresentou maior diversidade genética molecular ($D=0,69$). Em *E. pedicellatum* e *E. biflorum*, espécies mais restritas e ameaçadas de extinção, apresentaram menor diversidade genética ($D=0,48$ e $D=0,40$, respectivamente). Karron et al. (1988) estudaram a estrutura genética de populações de espécies restritas e de ampla distribuição do gênero *Astragalus* (Fabaceae), encontrando menores níveis de diversidade genética nas espécies restritas.

O resultado obtido pelo dendrograma foi considerado consistente, uma vez que, maiores níveis de similaridade genética, ou seja, de pouca diversidade foram, coerentemente, revelados nas subpopulações localizadas em áreas desprotegidas e submetidas à forte ação antrópica.

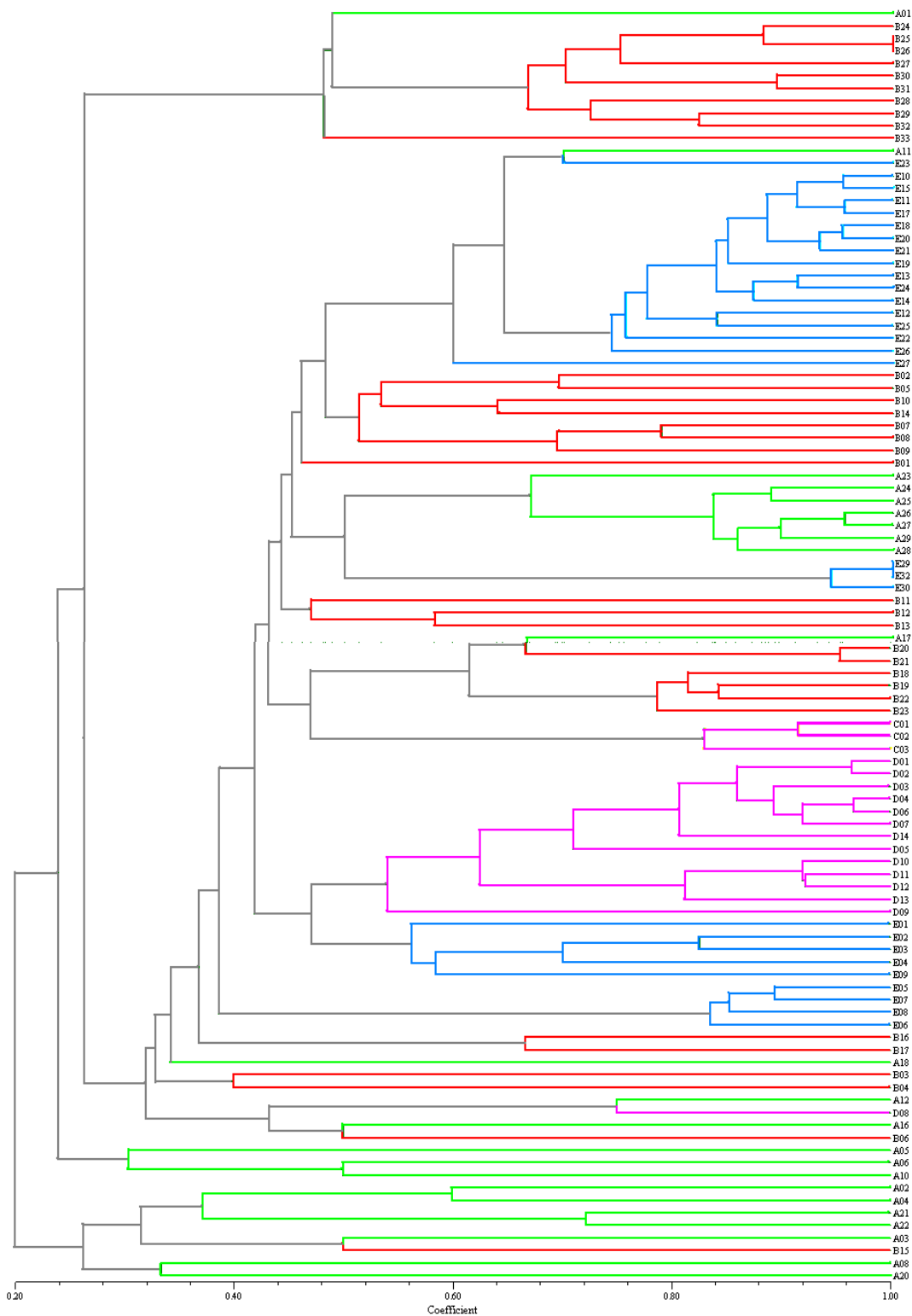


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genética obtida entre quatro subpopulações de *L. azurea*, definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas similaridades genéticas de Jaccard . As subpopulações foram representadas pelas seguintes cores: verde – PRCP I; azul – PRCP II; vermelha – Piedade (população de Una-BA) e em rosa – sapucaieira (população de Ilhéus-BA).

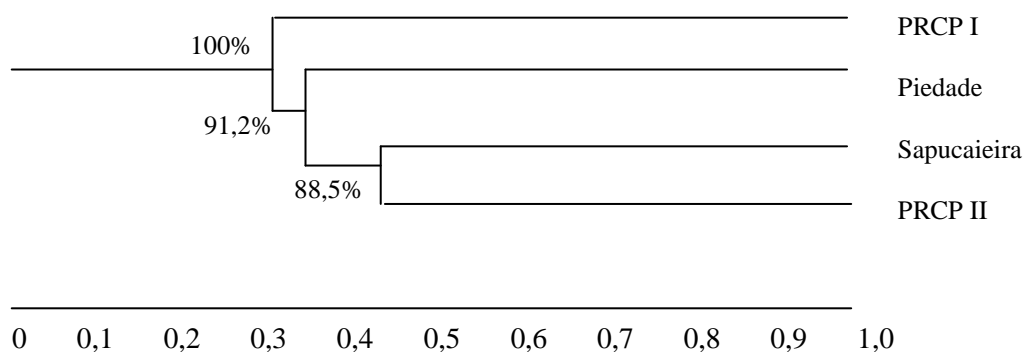


Figura 3 – Similaridade genética (Jaccard) em 4 subpopulações de *L. azurea* obtida pelo programa computacional Bood-P para determinar a confiabilidade dos nós a partir de 10.000 *bootstrap*. Onde PRCP I, Piedade e PRCP II pertencem à população de Una e Sapucaieira pertence à população de Ilhéus.

Com relação à AMOVA, em *Lymania azurea*, a análise genética detectou diversidade altamente significativa ($P < 0,001$) tanto inter como intra-subpopulacionalmente. Do total da variância genética molecular encontrada para a espécie, 20,53% se deve às divergências inter-subpopulações, enquanto que 79,48% são atribuídas às diferenças entre indivíduos intra-subpopulações. O Φ_{ST} observado para esta espécie foi, portanto, igual a 0,20 (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) baseada em quatro subpopulações de *Lymania azurea*, amostrados em duas populações no município de Una-BA e Ilhéus-BA, Bahia.

Fontes de Variação	GL	SQ	% de Variação	P	Estatísticas Φ_{ST}
Inter subpopulações	3	185,757	20,53	$P < 0,001^{**}$	0,20
Intra subpopulação	98	813,155	79,47	$P < 0,001^{**}$	$1 - \Phi_{ST} = 0,80$
Total	101	998,912	100,00		1

** altamente significativo

A variação de 20,53 % entre subpopulações demonstra forte estruturação entre estas subpopulações. Tal estrutura pode ser resultado da perda de habitat e fragmentação, que restringe o fluxo gênico, causando deriva genética e reduzindo seu tamanho efetivo.

São consideradas as mesmas hipóteses mencionadas acima quando analisada a variância molecular entre as populações Una-BA e Ilhéus-BA. Quando o Φ_{ST} detectado foi igual a 0,20, o que indica que 20,33% ocorrem devido à subdivisão e 79,67% ocorrem dentro das populações (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) baseada nas duas populações de *Lymania azurea*, amostrados no município de Una-BA e Ilhéus-BA, Bahia.

Fontes de Variação	GL	SQ	% de Variação	P	Estatísticas Φ_{ST}
Inter populações	1	75,971	20,33	P<0,001**	0,20
Intra população	100	922,941	79,67	P<0,001**	1 – Φ_{ST} = 0,80
Total	101	998,912	100,00		1

** altamente significativo

Na tabela 4, podem-se observar a variância genética para cada par de subpopulação, através do parâmetro utilizado Φ_{ST} .

Ao analisar os pares de sub-populações observou-se “estrutura genética”, entretanto o par que ocorre no interior da unidade de conservação, apresentou uma estruturação menos acentuada (Φ_{ST} = 0,098), quando comparada com as subpopulações Sapucaieira, em Ilhéus e PRCP II, localizada na área de borda da reserva (Φ_{ST} = 0,372). Este resultado indica a possível conectividade inter-populacional que ocorre no interior da Rebio-Una-BA, o que estaria permitindo a troca de alelos por seus dispersores, com conseqüente redução na estrutura genética. O contrário pode ser observado nas subpopulações desta espécie

localizadas em áreas de borda ou alteradas por ações antrópicas que apresentam uma redução da variabilidade genética quando comparadas com populações de áreas protegidas por unidades de conservação.

Tabela 4 - Estatísticas Φ_{ST} analisadas por pares de subpopulações em *Lymania azurea*.

Estatísticas	PRCP I	PRCP II	Piedade	Sapucaeira
Φ_{ST}				
PRCP I	-	-	-	-
PRCP II	0,274	-	-	-
Piedade	0,098	0,190	-	-
Sapucaeira	0,326	0,372	0,244	-

$P < 0,001^{**}$ (altamente significativo)

3.2.2 *L. smithii*

O índice de similaridade de Jaccard, obtido para espécie *L. smithii*, variou entre 0,4 e 1,0 e permitiu detectar no dendrograma, inter e intra-subpopulações, a formação de alguns grupos genéticos (Figura 4). Por sua vez, o menor índice de similaridade em *L. smithii* (0,4) supõe que esta espécie tenha maior similaridade que *L. azurea* (0,2), todavia este índice que foi inferior em *L. smithii* pode estar sendo influenciado pelo número amostral. Apesar deste resultado, em *L. smithii* não foram observados grupos estruturados geneticamente. Isto é um indicativo de que a variabilidade genética nesta espécie está amplamente distribuída pelas subpopulações amostradas, diferentemente do que ocorreu com *L. azurea*.

Em *L. smithii* o valor estimado para a correlação cofetética de Mantel (r), entre a matriz de similaridade genética e o dendrograma, foi de 0,689 o que permite discutir os resultados obtidos pelo dendrograma, sem a necessidade de publicar a matriz propriamente dita.

Comparando a subpopulação PRCP II, localizada em área de borda, em *L. azurea* formou-se um grupo geneticamente distinto com 70% de similaridade (Figura

2, em azul), indicando uma forte estruturação. Por sua vez, *L. smithii* apresentou nesta subpopulação maior diversidade genética (Figura 4). Quanto a subpopulação PRCP I foram constatados resultados similares de diversidade genética, entre as espécies, nas mesmas subpopulações amostradas em áreas de conservação.

Estes resultados demonstram que *L. azurea*, uma espécie endêmica e em perigo de extinção, quando habitada dentro da área de proteção ambiental mantém níveis de diversidade comparáveis à de uma espécie bem distribuída, confirmando a importância de áreas de proteção ambiental.

Largas comparações entre espécies geográficas restritas e difundidas indicaram que algumas tendências são evidentes com a espécie geográfica restrita, que tende a ter menos variabilidade genética do que espécie difundida (HAMRICK et al., 1992). Coates et al. (2006) ao analisar espécies irmãs em *Acacia* observou níveis mais baixos da diversidade genética populacional em *A. sciophanes* do que na espécie da irmã *A. anfractuosa* que é mais difundida e comum.

Portanto, a espécie *L. smithii* por apresentar maior distribuição na floresta, favorecendo um maior fluxo gênico e manutenção da variabilidade genética entre as subpopulações amostradas.

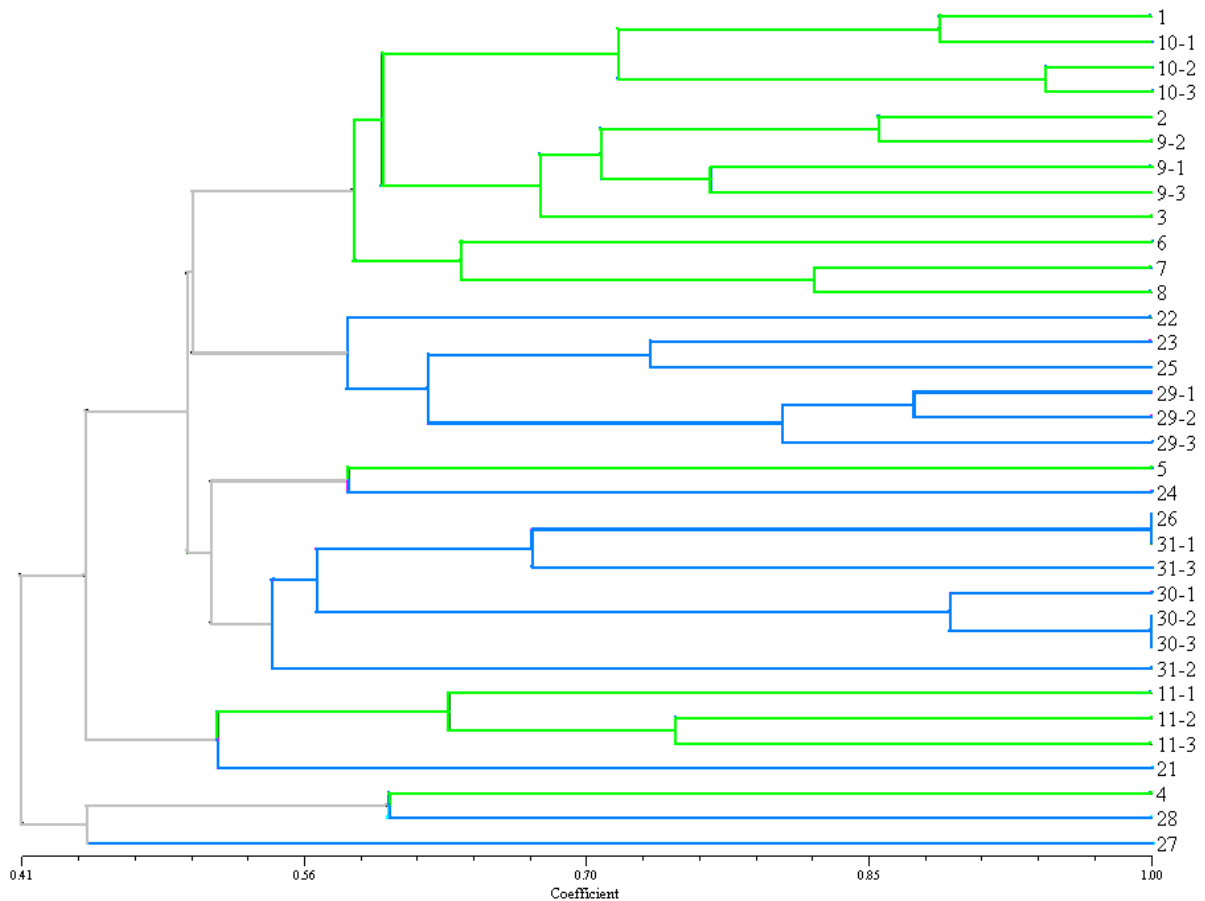


Figura 4 – Dendrograma de similaridade genética em *L. smithii* definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas similaridades genéticas de Jaccard. As subpopulações analisadas foram: PRCP I (verde) e PRCP II (azul).

O dendrograma gerado para as duas espécies simultaneamente, mostrou claramente a diferença de diversidade entre ambas (Figura 5). Vale ressaltar que nesta análise foram considerados os mesmos locos, portanto 39 marcadores genômicos. Para este dendrograma a correlação cofenética de Mantel foi de 0,839. Percebe-se claramente que as subpopulações de *L.azurea* em áreas antropizadas (borda da reserva e Ilhéus) mostrou-se em menor número de indivíduos e menor distância genética quando comparada com as subpopulações de *L.azurea* no interior da Unidade de Conservação e também quando comparada com as subpopulações de *L.smithii*.

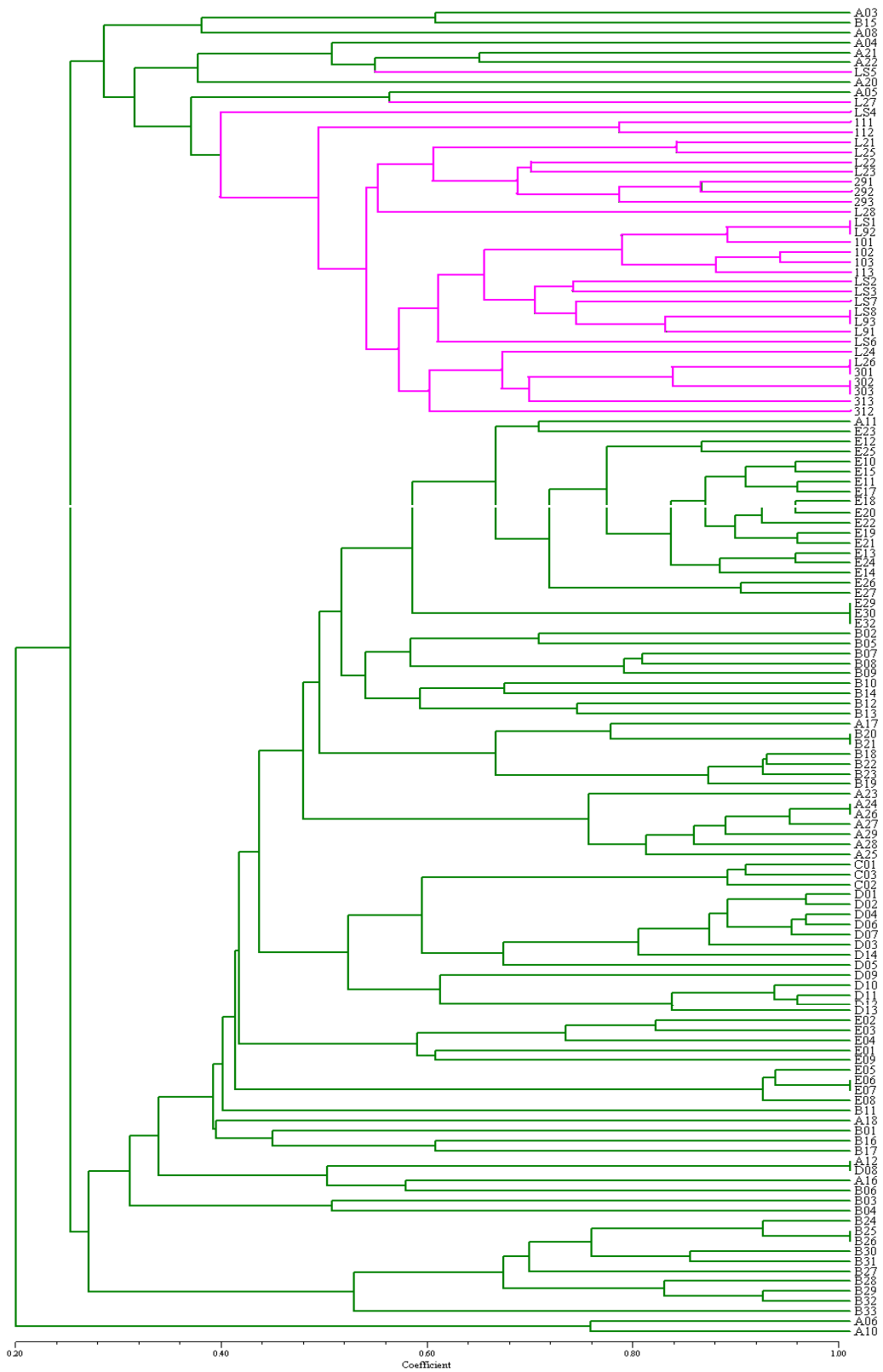


Figura 5 – Dendrograma de similaridade genética comparada entre *L. smithii* (rosa) e *L. azurea* (verde) definido pelo método de agrupamento UPGMA baseado nas similaridades genéticas de Jaccard.

Para *Lymania smithii*, o resultado da AMOVA (Tabela 5) indica que há diversidade genética altamente significativa ($P < 0,001$), tanto inter como intra-subpopulações. Do total da variância genética molecular encontrada para a espécie, 10,02% se deve às divergências inter-subpopulações, enquanto que 89,98% são atribuídas às diferenças entre indivíduos na subpopulação, sendo $\Phi_{ST} = 0,1$.

Tabela 5 - Resultado da Análise Molecular de Variância (AMOVA) baseada em duas subpopulações de *Lymania smithii*, amostrados no município de Una-BA, Bahia.

Fontes de Variação	GL	SQ	% de Variação	P	Estatísticas Φ_{ST}
Inter subpopulações	1	16,412	10,02	$P < 0,001^{**}$	0,1
Intra subpopulação	32	181,529	89,98	$P < 0,001^{**}$	$1 - \Phi_{ST} = 0,9$
Total	33	197,941	100,00		1

** altamente significativo

Com relação aos resultados da AMOVA, observa-se que cada uma das espécies apresenta um padrão de distribuição da variabilidade genética molecular diferente. As diferenças genéticas moleculares que existem entre as subpopulações de *L. azurea* indicam que 23,22% da variância genética molecular foram devido à subdivisão da subpopulação. Este valor é mais que o dobro do observado para as subpopulações de *L. smithii*, comprovando a forte estrutura genética ocorrente nesta espécie quando comparada com outra de mesmo gênero. Contudo, há estruturação em nível de subpopulação para as duas espécies, sendo o nível da estruturação mais crítico em *L. azurea*.

Padrões semelhantes e preocupantes de estrutura genética em subpopulações já foram relatados para outras espécies de bromélias. Cavallari et al. (2006), observaram, em três espécies de *Encholirium* (Bromeliaceae), diferenças genéticas significativas entre agrupamentos e especulam que as sementes possuem baixo poder de dispersão, não sendo carregadas pelo vento ou por animal, sendo

limitadas a curtas distâncias. Conforme Chung et al. (1999), a estrutura genética espacial dentro de populações é determinada principalmente pelos efeitos da dispersão limitada de pólen e sementes.

Em *Lymania* pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva e constatando em ocasião da coleta das espécies analisadas neste trabalho, raramente foi observado floração ou frutificação. Assim é possível que as florações sejam irregulares, com poucos indivíduos florescendo ao mesmo tempo na população, o que ocasionaria um limitado fluxo gênico. Dentre os fatores que podem conduzir à estruturação populacional, podem-se incluir causas antropogênicas relacionadas à destruição, à degradação e à fragmentação do habitat da região.

Gitzendanner e Soltis (2000) focalizam a importância em identificar e compreender causas históricas, em espécies raras e comuns, e como podem afetar padrões da variação genética. Não há nenhuma razão óbvia para a baixa distribuição em *L. azurea*, além da distribuição extremamente restrita, pois há poucas diferenças ecológicas e morfológicas entre *L. azurea* e *L. smithii*.

Porém, algumas hipóteses podem ser consideradas: (i) *L. smithii* sempre manteve maior distribuição geográfica, assim, mesmo depois de intensos desmatamentos a espécie conseguiu maior representatividade da diversidade genética e (ii) pode ocorrer especificidade de polinizador para as espécies.

3.3 Implicações para a conservação

A perda da diversidade genética (erosão genética) e extinção de espécies devem ser combatidas com o desenvolvimento de estratégias para a conservação da biodiversidade.

A chave para conservação de espécies em geral refere-se à manutenção do habitat apropriado, evitando desmatamentos e queimadas. , por tratar-se de epífitas, a derrubada de árvores leva a perda de muitas espécies que habitam em troncos de árvores.

Em *Lymania* foi encontrada uma estrutura genética que evidencia que a retirada de poucos indivíduos da natureza implica em risco para manutenção da diversidade genética. Isto é, deve-se evitar ao máximo retirar plantas das populações, exceto para compor reservas *ex situ*.

A conservação *ex situ* seria uma alternativa no caso de *Lymania*. Para compor bancos de germoplasma, é preferível retirar apenas sementes das populações, pois o impacto da retirada de sementes é bastante reduzido. Cavallari, 2004 estudou a taxa de germinação de sementes em espécies de *Encholirium* (Bromeliaceae) e constatou após diferentes tratamentos, elevadas taxas em todas as espécies. Contudo, em *Lymania* pode haver dificuldades em se obter um número representativo de sementes nas populações, que amostram a variabilidade existente. Sendo assim, deve ser considerada a retirada de plantas quando necessário.

Em *L. azurea*, as amostragens devem abranger o máximo de indivíduos de todas as populações, considerando que a AMOVA evidenciou forte estruturação genética na espécie ($\Phi_{ST} = 0,23$). Em *L. smithii*, os critérios de amostragem podem ser menos rígidos, já que apresentou metade do índice de variância genética molecular ($\Phi_{ST} = 0,10$). Portanto, um maior efeito de endogamia devido a subdivisão na população, representa maior magnitude da deriva genética, logo, menor representatividade do tamanho efetivo populacional (LOVELESS e HAMRICK, 1984).

Tendo em vista que a variabilidade e a endogamia estão diretamente relacionadas ao tamanho efetivo da população, conhecê-lo torna-se importante para definir as áreas que se pretende utilizar para coleta de sementes.

Em contraste com os chamados bancos de germoplasma (conservação *ex situ*), a conservação *in situ*, envolve a possibilidade de evolução da espécie dentro de ambientes naturais (SEBBENN et al., 2003). Portanto, para o estabelecimento e manejo de reservas genéticas, estudos genéticos e ecológicos tornam-se um pré-requisito básico para estabelecer áreas prioritárias de conservação, contudo, interesses econômicos e políticos têm influenciado a tomada de decisões em vista da conservação.

Na espécie *L. azurea*, entre as populações de Ilhéus-BA e Una-BA, a forte estruturação encontrada ($\Phi_{ST} = 0,20$) alertam a necessidade urgente de medidas de conservação. Desta forma, é favorável a existência de corredores ecológicos enriquecidos com esta espécie para promover o fluxo gênico, ampliando e restabelecendo a variabilidade genética natural do gênero na região sul baiana.

A fragmentação do habitat pode também afetar a abundância e a diversidade dos polinizadores da planta. González-Astorga et al. (2004) ao verificar o declínio na população de *T. achyrostachys* no local do estudo, concluiu a necessidade de uma

pesquisa para avaliar as conseqüências ecológicas em associação ao polinizador. Tal abordagem foi realizada nas populações de *Lymania* amostradas no presente projetos de ecologia e biologia reprodutiva desenvolvido na UESC.

4. Conclusões

- Cada espécie de *Lymania* apresentou um padrão de distribuição de diversidade genética molecular diferente. Sendo que *L. smithii*, espécie de ampla distribuição dentro do gênero, revelou maior diversidade genética.
- Para ambas as espécies a maior proporção da variância genética encontra-se dentro de subpopulações.
- *L. azurea* apresentou uma estimativa da endogamia devido à subdivisão de 0,2 e *L. smithii* 0,1, caracterizando baixa divergência genética inter-subpopulações.
- Os indivíduos de *L. azurea* apresentaram menores índices de estruturação ($\Phi_{ST} = 0,09$) na área da Rebio-Una-BA, subpopulações (PRCP I e Piedade). A maior estruturação encontrada foi entre a subpopulação Sapucaieira, em Ilhéus-BA e a subpopulação PRCP II, na borda da reserva, com $\Phi_{ST} = 0,37$.
- Assim, foi verificada estruturação em ambas as espécies analisadas. Contudo, *Lymania azurea*, está criticamente estruturada, necessitando medidas urgentes de conservação, como: bancos de germoplasma *ex situ*, reservas *in situ* e corredores ecológicos que favorecem a troca de alelos entre suas populações. É importante também sua inclusão imediata nas listas oficiais de espécies ameaçadas nacionais (IBAMA) e internacionais (IUCN).

5. Referências bibliográficas

- CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. Dissertação de Mestrado. São Paulo: ESALQ/USP, 2004.
- CAVALLARI, M. M.; FORZZA, R.C.; VEASEY, E. A.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. **Biodiversity and Conservation**, v.15, p.4357-4373, 2006.
- CHUNG, M. G.; CHUNG, J. M.; EPPERSON, B.K. Spatial genetic structure of allozyme, polymorphisms within populations of *Rhus trichocarpa* (Anacardiaceae). **Silvae genetic**. v. 48, p. 223-227, 1999.
- COATES, D. J.; TISCHLER, G.; MCCOMB J. A. Genetic variation and mating system in the rare *Acacia sciophanes* compared with its common sister species *Acacia anfractuosa* (Mimosaceae). **Conservation Genetics**. v. 7, p. 931-944, 2006.
- COELHO, A. S. G. **Bood-P: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap (software)**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2003.
- DE SOUSA, L. O. F. **Revisão Taxonômica do Gênero *Lymania* Read (Bromelioideae: Bromeliaceae)**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004.
- DICK, C. W.; BERMINGHAM, E.; LEMES, M. R.; GRIBEL, R. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3039-3049, 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissues. **Focus**. v.12, p. 13-15, 1990.
- ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D. J.; WINDUS J. L.; WOLFE A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porter* ssp. *Insperta* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**. V. 8, p. 443-451, 1999.

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

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

FISCHER, S. A.; FORE, S. A.; COLLINS, B. S. Genetic variation within and among patches of the clonal species, *Vaccinium stamineum* L. **Molecular Ecology**. v. 9, p. 1247-1252, 2000.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., E BRISCOE, D.A. Introduction to Conservation Genetics. **Cambridge University Press**, 617pp. 2002.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system and long-distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edullis* Mart). **Journal of Heredity**. v. 94, 5, p.399-406, 2003.

GITZENDANNER, M. A.; SOLTIS, P. S. Patterns of genetic variation in rare and widespread congeners. **American Journal of Botany**. v. 87, p.783-792. 2000.

GONZÁLEZ-ASTORGA J.; CRUA-ANGON A.; FLORES-PALACIOS A.; VOVIDES, A. P. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae) **Annals of Botany**. v. 94: 545–551, 2004.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, o manejo e a conservação dos recursos naturais. **Humanidades - Biologia**. v.48, p. 111-117. 2001.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**. v.6, p.95-124. 1992.

JACCARD, P. etude comparative de la distribution florale dans une porion des Alpes et des Jura. **Bull Soc Vandoise Sci Nat**, v.37, p. 547-579

KARRON, J. D., LINHART, Y. B., CHAULK, C. A., ROBERTSON, C. A. Genetic structure of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). **American Journal of Botany**. v.75, p.1114-1119. 1988.

KREHER S. A.; FORÉ S.A.; COLLINS B.S. Genetic variation within and among patches of the clonal species *Vaccinium stamineum* L. **Molecular Ecology**.v.9, p. 1247-1252, 2000.

LEME, E. M. C. Novas Bromeliáceas Nativas no Brasil. **Bradea**. v.4, p. 392-404. 1987.

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

MILLER, M. P. **AMOVA-PREP**. Department of Biological Sciences – Box 5640 Northern Arizona University Flagstaff, AZ 86011-5640 – mpm2@nauvax.ucc.nau.edu, 1998.

PAMPONÉT, V. C. C.; **Diversidade Clonal em Populações de *Lymania azurea* (Bromeliaceae) detectada Através de Marcadores RAPD**. Dissertação de Mestrado. Bahia: Universidade Estadual de santa Cruz. 2008.

PÉREZ, P. T.; ALBORNOA, J.; DOMINGUEZ, A. Na evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**. v.7, p.1347-1357, 1998.

PERSSON, H. A.; GUSTAVSSON B. A. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. **Molecular Ecology**. v.10, p.1385-1397, 2001.

READ R. W. The “Evolution” of a new genus *lymania* gen. nov. **Journal of the Bromeliad Society**. v.34. p.199-216, 1984.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. **Exeter Software**, Setauket, NY. 2000.

SANTOS, F. R.; E REDONDO, R. A. Bancos de DNA: Coleções Estrategicas para estudos da Biodiversidade. **Ludiana International Journal of Biodiversity**. v. 3, p.93-98. 2003

SEBBENN,R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, A. M In situ genetic conservation and number of tree for seed collect in *Genipa americana* L. population **Scientia Forestalis** v. 63, p. 13-22. 2003.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F. et al., Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. v. 26, p. 329-336, 2003.

TELLES, M. P. C. Marcadores RAPD na análise de diversidade genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade de divergência estimada. **Revista Animal Brasileira**. v.2, p. 87-95. 2001.

WRIGHTS. The genetic structure of populations. **Annals of Eugenetics**. v.15, p.395-420, 1951.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Foi verificada diversidade genética entre *ramets* do mesmo *genet*, portanto, as amostras de *L. azurea* coletadas em um mesmo *genet* são geneticamente distintas
- Mutações somáticas podem ser parte da causa da diversidade genética encontrada entre clones.
- A análise da diversidade genética entre *L. azurea* e *L. smithii* revelou padrões distintos de variabilidade genética. *L. smithii*, espécie mais comumente encontrada na floresta, apresentou maior diversidade.
- *L. azurea* apresentou 20% de endogamia devido à subdivisão, enquanto a *L. smithii* 10%.
- Logo, *L. azurea*, espécie ameaçada de extinção, apresenta forte estruturação, necessitando medidas urgentes de conservação,
- A subpopulação coletada em área de borda da Rebio-Una-BA, apresentou menor diversidade genética ($D = 0,4$) quando comparado com as subpopulações no interior da unidade de conservação ($D = 0,7$), necessitando de medidas urgentes de conservação.
- Tendo em vista os preocupantes níveis de variabilidade genética encontrados neste trabalho, é necessária a inclusão imediata de *L. azurea* nas listas oficiais nacionais (IBAMA) e internacionais (IUCN) de espécies ameaçadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

AYRES, D. R.; RYAN, F. J. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. **American Journal of Botany**. v. 86, p.344-353, 1999.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 690 p., 2000.

BOUZART, J. L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. **Biological Conservation**.v.99, p. 277-284, 2001.

BREMER, K.; CHASE, M. W.; STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Group – An ordinal classification for the families of flowering. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 85, p. 531-553, 1998.

BROWN, S. A. **Genetic variation within and between some rare and common taxa of cape proteaceae and the implications for their conservation**. Tese doutorado. Department of botany. Faculty of science. Rhodes University. Grahamstown. 169 p., 1999.

BUSH S. P. and MULCAHY D. L. The effects of regeneration by fragmentation upon clonal diversity in the tropical Forest shrub *Poikilacanthus macranthus*: random amplified polymorphic DNA (RAPD) results. **Molecular Ecology**.v.8, p. 865-870. 1999.

BUSHAKRA, J. M.; HODGES S.A., COOPER J. B.; KASKA, D. D. The extent of clonality and genetic diversity in the Santa Cruz Island ironwood, *Lyonothammus floribundus*. **Molecular Ecology**.v.8, p. 471-475,1999.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, G. J.; GRESSHOF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**. v.9, p. 553-556, 1991.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação.** Dissertação de Mestrado. São Paulo: ESALQ/USP, 2004.

CAVALLARI, M. M.; FORZZA, R.C.; VEASEY, E. A.; ZUCCHI, M. I.; OLOVEIRA, G. C. X. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. **Biodiversity and Conservation**, v.15, p.4357-4373, 2006.

CHASE, M. W.; FAY, M. F.; SAVOLAINEN, V. Higher-level classification in the Angiosperms: new insights from the perspective of DNA sequence data **Taxon**. v. 49, p.685-704. 2000.

CHUNG, M. Y., J. D. NASON, M. G. CHUNG. Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchid *Liparis kumokiri* and *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in sympatric populations. **Molecular Ecology**. v. 14, p. 4389-4402, 2005.

COATES, D. J.; TISCHLER, G.; MCCOMB J. A. Genetic variation and mating system in the rare *Acacia sciophanes* compared with its common sister species *Acacia anfractuosa* (Mimosaceae). **Conservation Genetics**. v. 7, p. 931-944, 2006.

COELHO, A. S. G. **Bood-P: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap (software).** Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2003.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York – Columbia University Press, 1261 p., 1981.

DE SOUSA, L. O. F. **Revisão Taxonômica do Gênero *Lymania* Read (Bromelioideae: Bromeliaceae).** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004.

DE SOUSA, L. O. F.; WENDT T.; BROWN, G. K.; TUTHILL D. E.; EVANS T. M. Monophyly and phylogenetic relationships in *Lymania* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on morphology and chloroplast DNA sequences. **Systematic Botany**. v. 32, p. 264 –270. 2007.

DICK, C. W.; BERMINGHAM, E.; LEMES, M. R.; GRIBEL, R. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. **Molecular Ecology**. v.16, p.3039-3049, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissues. **Focus**. v.12, p.13-15, 1990.

ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D. J.; WINDUS J. L.; WOLFE A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porter* ssp. *Insperrata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**. v. 8, p. 443-451, 1999.

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

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

FISCHER, S. A.; FORE, S. A.; COLLINS, B. S. Genetic variation within and among patches of the clonal species, *Vaccinium stamineum* L. **Molecular Ecology**. v. 9, p.1247-1252, 2000.

FLEISHMAM, E.; LAUNER, A. E.; SWITKY, K. R. et al. Rule and exceptions in conservation genetics – genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservation**. v. 98, p. 45-53, 2001.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., E BRISCOE, D.A. Introduction to Conservation Genetics. **Cambridge University Press**, 617pp. 2002.

FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. Workshop “**Revisão da Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção**”. Acesso em: janeiro de 2006. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/florabr/>>

FUTUYMA, D. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p.646, 1997.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic structure, mating system and long-distance gene flow in Heart of Palm (*Euterpe edullis* Mart). **Journal of Heredity**, 94, 5, p.399-406, 2003.

GITZENDANNER, M. A.; SOLTIS, P. S. Patterns of genetic variation in rare and widespread congeners. **American Journal of Botany**. v. 87, p.783-792. 2000.

GONZÁLEZ-ASTORGA J.; CRUA-ANGON A.; FLORES-PALACIOS A.; VOVIDES, A. P. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae) **Annals of Botany**. v. 94: 545–551, 2004.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, o manejo e a conservação dos recursos naturais. **Humanidades - Biologia**. v. 48, p.111-117. 2001.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New forests**. v.6, p.95-124. 1992.

HARTL, D.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates. 1997.

HILTON-TAYLOR, C. **IUCN Red list of threatened species**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 2000.

HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 86, p. 927-934, 1993.

JACCARD, P. etude comparative de la distribution florale dans une porion des Alpes et des Jura. **Bull. Soc. Vandoise Sci. Nat.**, v.37, p. 547-579

KARRON, J. D., LINHART, Y. B., CHAULK, C. A., ROBERTSON, C. A. Genetic structure of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). **American Journal of Botany**. v.75, p.1114-1119. 1988.

KREHER S. A.; FORÉ S.A.; COLLINS B.S. Genetic variation within and among patches of the clonal species *Vaccinium stamineum* L. **Molecular Ecology**.v.9, p.1247-1252, 2000.

KRESS, J. The systematic distribution of vascular epiphytes. **Selbyana**. v.9, p. 2-21. 1986.

LACERDA D. R.; ACEDO M. D. P.; LEMOS FILHO J. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**. v. 3, p. 87-92, 2002.

LANDAU, E. C. Padrões de ocupação espacial da paisagem da Mata Atlântica da Bahia, Brasil. In: P. I. Prado, E. C. Landau, R. T. Moura, L. P. S. Pinto, G. ^a B. Fonseca, K. Alger, organizadores. **Corredor da Biodiversidade da Mata Atlântica do Sul da Bahia**. Publicação em CR-ROM, Ilhéus-BA, IESB, CI, CABS, UFMG, UNICAMP. 2003.

LEME, E. M. C. Novas Bromeliáceas Nativas no Brasil. **Bradea**. v.4, p. 392-404. 1987.

LEME, E. M. C.; FORZZA, R. C. A new *Lymania* species from Bahia, Brazil. **Journal of the Bromeliad Society**. v. 51, p. 195-198, 2001

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual, 193 p., 1993.

LEME, E. M. **Canistrum. Bromélias da Mata Atlântica. Salamandra**. Rio de Janeiro. 1997

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

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. Sarasota: The bromeliad Socyete International, 143 p., 2000.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD. **Molecular Ecology**, n.3, p.91-95, 1996.

MATOCQ, M. D.; VILLABLANCA, F. X. Low genetic diversity in endangered species: recent or historic pattern? **Biological Conservation**. v.98, p.61-68, 2001.

MEDINA, E. Eco-fisiologia y evolucion de las Bromeliaceae. **Boletin de La Academia Nacional de Ciencias**. v. 59, p. 71-100, 1990.

MILLER, M. P. AMOVA-PREP. Department of Biological Sciences – Box 5640 Northern Arizona University Flagstaff, AZ 86011-5640 – mpm2@nauvax.ucc.nau.edu, 1998.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reactions. **Methods Enzymol.** v.55, p.335-350,1987.

PAMPONÉT, V. C. C.; **Diversidade Clonal em Populações de *Lymania azurea* (Bromeliaceae) detectada Através de Marcadores RAPD.** Dissertação de Mestrado. Bahia: Universidade Estadual de santa Cruz. 2008.

PÉREZ, P. T.; ALBORNOA, J.; DOMINGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology.** v.7, p. 1347-1357, 1998.

PERSSON, H. A.; GUSTAVSSON B. A. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. **Molecular Ecology.** v.10, p.1385-1397, 2001.

READ R. W. The “Evolution” of a new genus *Lymania* gen. nov. **Journal of the Bromeliad Society.** v.34. p.199-216, 1984.

ROCHA, C. F. D.; NUNES-FREITAS, A. F.; ROCHA-PESSÔA, T. C.; COGLIATTI-CARVALHO, L. Habitat disturbance in Brazilian Coastal sand dune vegetation and present richness and diversity of bromeliad species. **Vidalia.** v. 2(2), p. 50-55, 2004.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. **Exeter Software**, Setauket, NY. 2000.

ROMMEL, C.; BAIGHTS, B.. **Bromeliáceas como Ecosistemas.** México: Plaza y Valdés. 1999

SANTOS, ADALBERTO, J.; ROMERO, GUSTAVO. Q. A new bromeliad-dwelling jumping spider (Araneae, Salticidae) from Brazil. **Journal of Arachnology.** v. 32 , p.188-190, 2004.

SCARANO, F. R.; RIBEIRO, K. T.; MORAES, L. F. D.; LIMA, H. C. Plant establishment on flooded and unflooded patches in a freshwater Brazil. **Journal Tropical Ecology.** v. 14, p. 793-803. 1997.

SEBBENN,R.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, A. M In situ genetic conservation and number of tree for seed collect in *Genipa americana* L. population **Scientia Forestalis** v. 63, p. 13-22. 2003.

SHARMA I. K. Understanding clonal diversity patterns through allozyme polymorphism in an endangered and geographically restricted Australian shrub, *Lieria baeuerlenii*, and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 29, p. 681-695. 2001

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F. et al., Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. v. 26, p. 329-336, 2003.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromeliaceae (Bromelioideae). **Flora Neotropica** v.14, p. 1493-2142. 1979

STEWART Jr. C. N.; EXCOFFIER L. Assessing populations genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Strawberry). **Journal of Evolutionary Biology**. v.9. p.153-171.1996.

TELLES, M. P. C. Marcadores RAPD na análise de diversidade genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade de divergência estimada. **Revista Animal Brasileira**. v.2, p. 87-95. 2001.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**.v.18, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT S. The genetic structure of populations. **Annals of Eugenics**. v.15, p.395-420, 1951.

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