

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

ESTER UJIE NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Pitcairnia flammea* (BROMELIACEAE),
OCORRENTE EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA, POR
MEIO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS**

ALEGRE, ES
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

ESTER UJIE NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Pitcairnia flamma* (BROMELIACEAE),
OCORRENTE EM FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA, POR
MEIO DE FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Andreia Barcelos Passos Lima

ALEGRE, ES
2010

ESTER UJIE NOGUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Pitcairnia flammea* (BROMELIACEAE), OCORRENTE EM
FRAGMENTOS DE MATA ATLÂNTICA, POR MEIO DE FERRAMENTAS
BIOTECNOLÓGICAS**

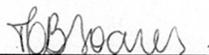
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 31 de março de 2010

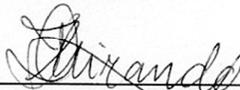
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Andreia Barcelos Passos Lima
Centro de Ciências Agrárias – UFES
Orientadora



Prof.ª Dr.ª Taís Cristina Bastos Soares
Centro de Ciências Agrárias – UFES
Co-orientadora



Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda
Centro de Ciências Agrárias – UFES



Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo
Centro de Ciências Agrárias – UFES



Prof.ª Dr.ª Cândida H.C. de Magalhães Bertini
Universidade Federal do Ceará

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

N778c Nogueira, Ester Ujiie, 1985-
Caracterização de *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae), ocorrente em fragmentos de Mata Atlântica, por meio de ferramentas biotecnológicas / Ester Ujiie Nogueira. – 2010.
71 f. : il.

Orientador: Andreia Barcelos Passos Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Bromélia – Biotecnologia. 2. Bromélia – Genética vegetal. 3. Bromélia – Recursos do germoplasma. 4. Bromélia – Melhoramento genético. 5. Bromélia – Mata Atlântica – Conservação. I. Lima, Andreia Barcelos Passos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 63

*Aos meus pais,
Edison Castilho Nogueira e
Taeko Ujiie Nogueira,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Edison e Taeko, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo, José, pelo amor, apoio e compreensão sempre constantes.

Aos meus irmãos, Marcos e Raquel, pelo amor e incentivo.

A Prof^a. Dra. Andreia Barcelos Passos Lima pela orientação, amizade e confiança.

A Prof^a. Ana Paula Gelli de Faria da Universidade Federal de Juiz de Fora por me apresentar às bromélias, pelo apoio, pelas dicas, amizade e toda disposição em ajudar.

A Prof^a Dra. Taís Cristina Bastos Soares pelo auxílio durante toda a realização dos experimentos no Laboratório de Biotecnologia.

Ao Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo pela dedicação, disposição e, principalmente, pela oportunidade de realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda pela ajuda e dedicação durante as preparações das reações de PCR e análises de géis.

A Prof^a. Nina Cláudia Barboza da Silva pela amizade e por todas as dicas e sugestões durante a realização dos experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (Biotecnologia Vegetal).

A Prof^a. Miriam Cristina Oliveira da Costa por me ensinar que expedições ao campo podem ser agradáveis e divertidas.

Aos queridos alunos da Iniciação Científica, Fernanda Campanharo Favoreto, Eldelon de Oliveira Pereira, Anelise Machado Marques, Evandro Pianissola Machado e Letícia Kuster Mitre, pelas incansáveis horas de trabalho, companhia e auxílio imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Ao biólogo Dayvid Rodrigues Couto pelo auxílio em todas as coletas em campo.

Ao técnico de laboratório, Fabiano Costa Santiliano, pelo auxílio nas preparações dos reagentes e reações de PCR, pela companhia e amizade.

Ao colega de mestrado Pablo Diego Silva Cabral pela colaboração durante toda a realização do trabalho de diversidade genética e principalmente pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Carvalho da Universidade Federal de Viçosa por gentilmente ceder o Laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal para a condução dos experimentos, pelas análises de citometria e edição dos histogramas.

A Prof^a. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi da Universidade do Estado do Mato Grosso pelas dicas, disposição e dedicação nas análises de diversidade genética.

A querida “Madá”, secretária da Pós-Graduação, pelo auxílio nos assuntos administrativos.

A Luciana Fernanda Puppim Pereira, secretária do Departamento de Produção Vegetal, pela amizade, companheirismo e auxílio.

A minha amiga, Paula Alvarez Cabanez, por todos os momentos de descontração e dificuldades compartilhados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1	A Família Bromeliaceae e a Subfamília Pitcairnoideae	1
1.2	Importância Ecológica e Econômica da Família Bromeliaceae	3
1.3	Ameaças à preservação de Bromeliaceae	4
1.4	Referências bibliográficas	6
2	DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Pitcairnia flammea</i> E TRANSFERABILIDADE DE PRIMERS SSR E ISSR	9
2.1	Resumo	9
2.2	Abstract	10
2.3	Introdução	11
2.4	Material e métodos	15
2.4.1	Coletas em campo	15
2.4.2	Critérios gerais da amostragem	16
2.4.3	Estabelecimento de métodos para conservação de material vegetal e extração de DNA	16
2.4.4	Extração de DNA	17
2.4.5	Análise dos marcadores moleculares RAPD	18
2.4.6	Análises estatísticas computacionais	19
2.4.7	Transferibilidade de primers SSR e ISSR	20
2.5	Resultados e Discussão	21
2.5.1	Métodos de conservação do material vegetal e extração de DNA	21
2.5.2	Diversidade genética em populações naturais de <i>P. flammea</i>	22
2.5.3	Transferibilidade de primers SSR e ISSR para <i>P.flammea</i>	33
2.6	Conclusões	35
2.7	Referências bibliográficas	37
3	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>Pitcairnia flammea</i>	42
3.1	Resumo	42
3.2	Abstract	43
3.3	Introdução	44
3.4	Material e métodos	47
3.5	Resultados e discussão	48
3.6	Conclusão	51
3.7	Referências Bibliográficas	52
4	MENSURAMENTO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE <i>Pitcairnia flammea</i> LINDLEY (BROMELIACEAE) VIA CITOMETRIA DE FLUXO	55
4.1	Resumo	55
4.2	Abstract	56
4.3	Introdução	57
4.4	Material e métodos	60
4.4.1	Material biológico	60
4.4.2	Citometria de fluxo	60
4.5	Resultados e Discussão	62
4.6	Conclusão	66
4.7	Referências bibliográficas	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

O risco de extinção de espécies biológicas torna-se cada vez mais presente e ameaçador. Dentre as espécies ameaçadas de extinção, destacam-se as da família Bromeliaceae. A principal causa da extinção dessas espécies é a destruição dos habitats naturais, pois além delas apresentarem alto grau de endemismo, existe uma intensa exploração extrativista, que visa suprir a grande demanda de bromélias no mercado de plantas ornamentais.

1.1 A Família Bromeliaceae e a Subfamília Pitcairnoideae

As Bromélias podem ser encontradas em praticamente todos os ecossistemas neotropicais, desde o nível do mar, em praias, mangues e restingas, até altitudes de 5000 m, nos Andes, podendo ser terrestres, epífitas ou rupícolas (LEME, 1993; MEDINA, 1990). A única exceção ao padrão de distribuição exclusivamente americano é a espécie *Pitcarnia feliciana*, encontrada na região da Guiné, na África (LEME, 1993).

Com ampla distribuição no continente americano, ocorrendo desde a região sul dos EUA (latitude 37° N) até a região central da Argentina e Chile (latitude 44° S), possui três centros de diversidade aceitos: o norte dos Andes, com extensões até o México e as Antilhas, o Planalto das Guianas e o Leste do Brasil (SMITH; DOWNS, 1974).

As bromélias estão presentes em todo o território brasileiro, desde a caatinga até os campos de altitude, passando pelos campos rupestres, Floresta Amazônica, restinga e, especialmente, na Floresta Atlântica, que merece destaque por apresentar um grande número de espécies e alto grau de endemismo (LEME, 1993).

A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 56 gêneros e 2885 espécies (LUTHER, 2000), sendo provavelmente a maior família botânica exclusiva do Novo Mundo (LEME, 1993). Segundo Cronquist (1981), Bromeliaceae Juss. é a única família da ordem Bromeliales, subclasse Zingiberidae, classe Liliopsida.

São reconhecidas três subfamílias para Bromeliaceae: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (CRONQUIST, 1988). A diferenciação entre as subfamílias é baseada em características morfológicas, tais como tipo de frutos e sementes, margem das folhas e posição do ovário (SMITH; DOWS, 1974).

Smith e Downs (1974) reconhecem 731 espécies e 13 gêneros para Pitcairnioideae. Atualmente, 16 gêneros são aceitos, sendo que a maioria deles está relacionada a áreas de vegetação aberta da América do Sul (FORZZA, 2001). O planalto das Guianas é considerado o centro de diversidade da subfamília, por apresentar o maior número de gêneros, muitos deles endêmicos (VARADARAJAN; GILMARTIN, 1988). No Brasil, a subfamília é representada por onze gêneros, um deles é *Pitcairnia* (FORZZA, 2001).

Pitcairnia (*sensu lato*) com cerca de 350 espécies é o maior e o mais distribuído gênero de Pitcairnioideae, ocorrendo no México, América Central, Antilhas e por quase toda a América do Sul, com a maior riqueza de espécies na região andina (SMITH; DOWNS, 1974; LUTHER, 2004).

Para o Brasil, Smith e Downs (1974) citaram 28 espécies. Posteriormente a esta obra, novas espécies foram descritas, alguns táxons foram sinonimizados e novas ocorrências foram registradas, principalmente na região limítrofe do Brasil com a Venezuela (WENDT; CHAMAS, 1997; HOLST, 1997; WENDT et al., 2000; LUTHER, 2004; TATAGIBA et al., 2004).

Assim, atualmente, 43 espécies podem ser contabilizadas para o território brasileiro. As espécies de *Pitcairnia* registradas para o Brasil possuem padrões de distribuição bem definidos por províncias fitogeográficas (WENDT; CHAMAS, 1997). Levantamentos preliminares em herbários e literatura indicam que nos domínios da floresta Amazônica ocorrem 18 espécies quase exclusivas dessa região. Nos domínios do cerrado, podem ser encontradas cerca de 10 espécies e na costa leste do Brasil, são encontradas cerca de 15 espécies (MARTINELLI; FORZZA, 2006).

Dentre os táxons da costa leste, merece destaque o “complexo *Pitcairnia flammea*”, que segundo Martinelli e Forzza (2006), envolve muitas variedades e necessita de revisão, o que possivelmente levará a uma modificação do número de espécies para esta área.

1.2 Importância Ecológica e Econômica da Família Bromeliaceae

A Família Bromeliaceae é essencial para a manutenção da biodiversidade, sendo uma das mais visitadas por pássaros e servindo de abrigo e alimentação para muitas espécies (PIZO, 1994; SIQUEIRA FILHO, 2001).

As bromélias são também bons indicadores ambientais. Espécies de *Tillandsia* foram utilizadas como bioindicadores da poluição do ar na cidade de São Paulo por Figueiredo et al. (2001, 2004) e no biomonitoramento atmosférico, por Amado e colaboradores (2002). Elias e colaboradores (2006) não recomendam o uso de *Tillandsia usneoides* para essa finalidade, por ser uma espécie exótica e propõem o uso de espécies de bromélias nativas, entre as quais se destacam *Aechmea coelestis*, *Nidularium cf. inocentii*, *Nidularium krisgreeniae*, *Vriesea carinata*, *Canistropsis billbergioides* e *Vriesea vagans*.

Várias bromélias apresentam grande valor econômico. O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Murril) é utilizado na alimentação na forma de sucos, doces e *in natura*. O caroá-verdadeiro (*Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez) é utilizado para produção de fibras naturais (RIBEIRO, 2007).

Outra finalidade econômica de muitas espécies é a extração da bromelina, uma protease (BALLS et al., 1941; HEINICKE; GORTNER, 1957; MURACHI; NEURATH, 1960) utilizada pela indústria alimentícia (HEINICKE; GORTNER, 1957; WHITAKER, 1976; DIAZ, 1988; SCHMITT, 1994) e pela medicina (SILVA, 1991; HEINICKE; GORTNER, 1957; WHITAKER, 1976; TAUSSIG et al., 1985).

Entretanto, atualmente, o uso mais comum é a aplicação de bromélias em projetos paisagísticos como espécies ornamentais, especialmente as espécies pertencentes aos gêneros *Aechmea*, *Billbergia*, *Canistrum* e *Cryptanthus* (SOUSA; WANDERLEY, 2000). As características que explicam o interesse por essas plantas são o exotismo, a beleza e a durabilidade. Suas inflorescências têm despertado interesse na utilização como flor de corte (TERAO et al., 2005).

1.3 Ameaças à preservação de Bromeliaceae

Processos predatórios, que geralmente não respeitam dinâmicas naturais de regeneração e sustentabilidade, têm promovido severos danos ambientais incluindo perda de diversidade biológica, tanto de bromélias quanto de outras espécies que com elas coexistem (BITTENCOURT et al., 2002).

A Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção de 1992 (IBAMA, 1992) inclui 15 espécies de bromélias. Segundo a Instrução Normativa de Setembro de 2008 do Ministério do Meio Ambiente, atualmente 38 espécies de bromélias estão ameaçadas de extinção e 136 espécies estão listadas com deficiência de dados.

Pavan-Fruehauf (2000) destaca o Sudeste brasileiro como o maior centro de diversidade de bromélias com grau de endemismo atingindo 74,4% dessas espécies. Segundo Pádua e Pádua (2002), a destruição da Mata Atlântica significa que espécies endêmicas, como as bromélias, correm o risco de desaparecer para sempre.

De acordo com o Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428, de 2006, segundo Decreto nº 6.660, de 21 de novembro de 2008, publicado no Diário Oficial da União de 24 de novembro de 2008 (IBGE, 2008), a Mata Atlântica abrangia originalmente 1.315.460 km² no território brasileiro, o que correspondia a aproximadamente 15% do Brasil. Atualmente, está reduzida a 7,91% de sua área original, ou seja, 102.012 km² (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE, 2009).

Para destacar sua importância no cenário nacional e internacional, alguns trechos foram reconhecidos como Patrimônio Mundial pela ONU e indicados como Sítios Naturais do Patrimônio Mundial e Reserva da Biosfera da Mata Atlântica pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. Além disso, é considerada Patrimônio Nacional na Constituição Federal de 1988.

No Estado do Espírito Santo, cuja área territorial é de 4.616.591 hectares, a Mata Atlântica é composta pelos ecossistemas: Floresta, Restinga e Mangue. A área original de Mata Atlântica no Estado era de 4.614.841 hectares, entretanto os remanescentes florestais totais são de 508.25 hectares (11,01% do original). A Floresta que em 2005 constituía área de 476.173 hectares, em 2008 foi reduzida a

área de 475.600 hectares, contabilizando-se um total de 573 hectares desflorestados (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS - INPE, 2009).

Segundo Andrade e Demattê (1999), o valor ornamental e a falta de produção comercial de bromélias levam ao extrativismo em grandes quantidades para comercialização no mercado interno e externo. Adicionalmente, para que essa atividade seja sustentável, é indispensável que se conheça e caracterize a biodiversidade, auxiliando na elaboração de estratégias de conservação (SALES et al.,1998).

Com base no que foi exposto e considerando a escassez de informações relativas à espécie *Pitcairnia flammea*, fica evidente a necessidade de estudos nas áreas de cultura de tecidos, citogenética e diversidade genética em populações naturais de espécies ornamentais, visando auxiliar no estabelecimento de estratégias para a sua conservação.

1.4 Referências bibliográficas

- AMADO, F. G. M., ANDRADE, L. R., FARINA, M.; MALM, O. Hg localization in *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae), an atmospheric biomonitor. **Atmospheric environment**, v. 36, p. 881-887, 2002.
- ANDRADE, F. S. A.; DEMATTE, M. E. S. P. Estudos sobre produção e comercialização de Bromélias nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 5. n. 2., p. 93-161, 1999.
- BALLS, A. K.; THOMPSON, R. R.; KIES, M. W. Bromelain - Properties and commercial production. **Industrial Engineering Chem.** p. 33-950, 1941.
- BITTENCOURT, A. M.; PÖLZI, P. F. K.; BLUM, C. T.; HOFFMANN, T.; SANTOS, A. J. Aspectos econômicos das bromélias no Estado do Paraná. In: Congresso ibero-americano de pesquisa e desenvolvimento de produtos florestais, Curitiba. Anais ... Curitiba: UFPR, p. 134, 2002.
- conservacionistas. In: TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Atlas da biodiversidade de Pernambuco**. Recife. SCTMA & Massangana. 2001. p.219-228.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.
- CRONSQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. 2 ed. New York, The New York Botanical Garden, 1988. 555p.
- DIAZ, N. A. M. Enzimas em panificação. In: Vitti, P. Seminário sobre uso de enzimas em biscoitos e panificação. 1988. Campinas: ITAL, 19-26.
- ELIAS, C.; FERNANDES, E. A. DE N.; FRANÇA, E. J. DE; BACCHI, M. A. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. **Biota Neotrop.**, Campinas, v. 6, n. 1, 2006 .
- FIGUEIREDO, A. M. F., ALCALA, A. L., TICIANELLI, R. B., DOMINGOS, M.; SAIKI, M. The use of *Tillandsia usneoides* L. as bioindicator of air pollution in São Paulo, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 259, p. 59-63, 2004.
- FIGUEIREDO, A.M.F., SAIKI, M., TICIANELLI, R.B., DOMINGOS, M., ALVES, E.S. & MARKERT, B. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 249, p. 391-395, 2001.
- FORZZA, R. C. Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. F. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). (Tese de doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas Dos Remanescentes Florestais Da Mata**

Atlântica - Período 2005-2008: Relatório Parcial. 2009. Disponível em: <<http://mapas.sosma.org.br/dados/>>. Acesso em: 07 de fev de 2009.

HEINICKE, R. M.; GORTNER, W. A. Stean bromelain: A new protease preparation from pineapple plants. **Economic Botany**, v. 11, p. 225, 1957.

HOLST, B. K. Bromeliaceae. In: BERRY, P. E., HOLST, B. K.; YATSKIERYCH, K. **Flora of the Venezuelan Guayana (Araliaceae-Cactaceae)**. Missouri Botanical Garden St. Louis, v.3, p. 548-676, 1997.

IBAMA. 1992. Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção: Portaria Nº 37. 1992. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm>>. Acesso em 05 de abril de 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428, de 2006.** Decreto nº 6.660. 2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/mapas_doc6.shtm>. Acesso em 18 de ago de 2009.

LEME, E. M. C. 1993. **Bromélias na natureza.** Rio de Janeiro, Ed. Marigo Comunicação Visual.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials.** 9 ed. Sarasota, The Bromeliad Society International. 2004.

LUTHER, H.E. 2000. An alphabetical list of Bromeliad binomials. Disponível em <http://www.selby.org/research/bic/Binom_2000_Alpha.pdf>. Acesso em 6 de janeiro de 2003.

MARTINELLI, G., FORZZA, R. C. *Pitcairnia* L.Hér. (Bromeliaceae): uma nova espécie, *P. azouryi* Martinelli & Forzza, e observações sobre *P. encholirioides* L. B. Sm. **Revista Brasil. Bot.**, v.29, n.4, p. 603-607, 2006.

MEDINA, E. Eco-fisiologia y evolution de lãs Bromeliaceae. **Boletín Academia Nacional Ciências**, v. 59, p. 72-100, 1990.

MURACHI, T.; NEURATH, H. Fractionation and specificity studies on stem bromelain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 235, n. 1, 1960.

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

PAVAN-FRUEHALF, S. 2000. Plantas medicinais de Mata Atlântica: Manejo Sustentado e Amostragem. 1 ed. São Paulo: Annablume, FAPESP.

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

RIBEIRO, M. B. Fibrocultura: o Semi-Árido é o paraíso das fibras vegetais. In: RIBEIRO, M. B. (Ed.). **A potencialidade do semi-árido brasileiro**. Brasília: Revan, 2007. p.121-136.

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

SCHMITT, M. Ingredients. Food Marketing and Technology, v.8, p. 14-16, 1994.

SIQUEIRA FILHO, J. A. Bromélias em Pernambuco: diversidade e aspectos

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**, v.14, p.16-62, 1974.

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

TATAGIBA, F., ALVES, R. J. V.; SILVA, B. R. Two new species of *Pitcairnia* from Brazil. **Selbyana**, v. 25, p. 27-32, 2004.

TAUSSIG, S. J.; SZEKERCZES, J.; BATKIN, S. Inhibition of tumors Growth *in vitro* by bromelain, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosus*). **Journal of Medicinal Plant research**, v. 6, p. 583-639, 1985.

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

VARADARAJAN, G. S.; GILMARTIN, A. J. 1988. Taxonomic realignments within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematic Botany**, 2:294-299.

WENDT, T., CANELA, M. B. F., MORREY-JONES, J., HENRIQUES, A. B.; RIOS, R. I. Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. **Systematic Botany**, v. 25, p. 389-398, 2000.

WENDT, T.; CHAMAS, C. C. 1997. As Pitcairnias do leste do Brasil . suas verdadeiras identidades. **Bromelia**, 4:12-18.

WHITAKER, J. R. Practical applications of enzyme technology. **Enzymes - Use and Control in Food**, 1976.

2 CAPÍTULO 1 – DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Pitcairnia flammea* E TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS SSR E ISSR

2.1 Resumo

NOGUEIRA, Ester Ujiie, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, março de 2010. **Diversidade genética em populações naturais de *Pitcairnia flammea* e transferibilidade de primers SSR e ISSR.** Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima.

Os marcadores moleculares RAPD são úteis para a análise da diversidade genética possibilitando uma amostragem mais ampla de genomas desconhecidos. Os marcadores SSR e ISSR também são utilizados para esse fim, mas ainda existem poucos desenvolvidos para Bromeliaceae, o que implica na validação da sua transferibilidade entre espécies dessa família. O objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética de *P. flammea* utilizando marcadores RAPD e testar a transposição de marcadores SSR e ISSR para esta espécie. Foram utilizados 8 primers RAPD no estudo de diversidade e para a validação da transferibilidade de marcadores moleculares foram usados 4 primers ISSR e 1 SSR. Os 8 primers RAPD geraram um total de 55 bandas, sendo 41 polimórficas. Do total da variância genética molecular encontrada, 69,18% se devem às diferenças entre indivíduos dentro de cada local de coleta e 30,82% é atribuída às divergências entre os três locais amostrados. A variação genética entre populações, $G_{st}=0,2340$, indicou grande proximidade genética. As populações pertencentes aos locais de coleta mais próximos geograficamente apresentaram menor distância genética entre si (0,04) refletindo em maior identidade genética (0,9714). A maior variação genética foi observada entre os indivíduos amostrados no Local de coleta III, portanto a população existente nesta localidade pode ser considerada prioritária em trabalhos de conservação. Nos ensaios de transposição, foram obtidas 17 bandas com os marcadores ISSR, sendo 6 polimórficas. Para o marcador SSR, foi produzida 1 banda monomórfica. Os marcadores RAPD foram eficientes para analisar a diversidade genética de *P. flammea* intra e interpopulacional e a transferibilidade dos marcadores SSR e ISSR foi validada em *P. flammea*.

2.2 Abstract

NOGUEIRA, Ester Ujje, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, in march 2010. **Genetic diversity in natural populations of *Pitcairnia flammea* and transferability of SSR and ISSR primers.** Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima.

RAPD molecular markers are useful for analyzing genetic diversity, enabling a broader sampling of unknown genomes. SSR and ISSR markers are also used for this purpose, but still only a few are developed to Bromeliaceae, which implies the validation of their transferability among species of this family. This study aims at studying the genetic variability of *P. flammea* by means of RAPD markers and testing the transposition of SSR and ISSR markers for this species. 8 RAPD primers were used in the study of diversity, and 4 ISSR primers and 1 SSR primer were used to validate the transferability of molecular markers. The 8 RAPD primers generated a total of 55 bands, 41 of which polymorphic. From the total molecular genetic variance found, 69.18% are due to the differences between individuals within each collection site, and 30.82% are due to differences between the three sites sampled. The genetic variation among populations, $G_{st}=0.2340$, has indicated great genetic proximity. The populations belonging to the geographically closest collection sites presented a smaller genetic distance between them (0.04), reflecting a greater genetic identity (0.9714). The greatest genetic variation was observed among the individuals sampled in the Collection Site III, so the existing population in this site may be considered a priority in conservation works. In the tests of transposition, 17 bands were obtained with ISSR markers, 6 of which being polymorphic. For the SSR marker, 1 monomorphic band was produced. RAPD markers were efficient for analyzing the intra and inter populational genetic diversity of *P. flammea*, and the transferability of SSR and ISSR markers was validated in *P. flammea*.

2.3 Introdução

A variabilidade genética é de importância fundamental para o potencial evolutivo de uma espécie e a redução da variabilidade genética pode conduzir uma espécie à extinção (BOUZAT, 2001).

Segundo Silveira et al. (2009), entre os marcadores moleculares conhecidos, o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), técnica desenvolvida por Williams et al. (1990), mostra-se uma ferramenta útil para a análise da diversidade genética molecular em populações naturais de plantas. Os marcadores RAPD possibilitam a construção de mapas genéticos, o estabelecimento de relações filogenéticas entre diferentes táxons, a obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, representando também uma ferramenta poderosa para a análise da diversidade genética molecular em populações de melhoramento e bancos de germoplasma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), sendo largamente empregada para a caracterização de populações de plantas (HUFF et al., 1993).

O fato dos *primers* de RAPD serem construídos para anelamento aleatório no genoma é que torna a técnica simples e aplicável a qualquer organismo. Isso significa que não é necessário o prévio conhecimento de sequências de DNA da espécie a ser estudada, tornando a técnica ideal para gerar informações a respeito da estrutura genética de populações em táxons pouco estudados (BROWN, 1999). Os marcadores RAPD também são eficientes para estudos de divergência genética, nos quais os indivíduos analisados são geneticamente próximos (WADT et al., 2004). Essa particularidade é de especial interesse para o estudo de espécies raras, com populações pequenas, e, principalmente, que apresentam reprodução assexuada como principal forma de propagação (PALÁCIOS; GONZÁLES-CANDELAS, 1997). Em espécies com essas características, é esperado um baixo grau de variabilidade genética, sendo RAPD o marcador ideal por demandar pouca quantidade de DNA para as análises (CAETANO-ANOLLÉS et al., 1991; JAMES; ASHBURNER, 1997; PALÁCIOS; GONZÁLES-CANDELAS, 1997) e pela grande possibilidade de se detectar polimorfismo genético (ROSSETTO et al., 1995; FRITSCH; RIESEBERG, 1996).

Os marcadores RAPD podem subestimar a estrutura genética de populações devido à sua característica dominante; entretanto, fornecem informação suficiente para o desenvolvimento de estratégias de conservação de plantas (JAMES; ASHBURNER, 1997).

Cavallari (2004) caracterizou a diversidade genética molecular existente nas bromélias *Encholirium biflorum*, *E. pedicellatum* e *E. subsecundum*, com auxílio de marcadores moleculares RAPD, iniciando um estudo fundamental para obtenção do conhecimento da distribuição dessa diversidade, revelando uma grande variabilidade interespecífica, bem como entre diferentes populações das espécies analisadas. O estudo permitiu o estabelecimento de relações entre espécies de taxonomia pouco resolvida, fornecendo também dados para suporte do manejo e conservação das espécies em extinção do citado grupo.

Panponét et al. (2008) utilizaram marcadores RAPD para estudar a diversidade clonal de *Lymania azurea* (Bromeliaceae). Esses autores afirmaram que o hábito clonal geralmente restringe a variabilidade genética de uma população; entretanto, é possível encontrar diversidade genética semelhante a plantas de reprodução sexuada entre plantas clonais, inclusive entre espécies da família Bromeliaceae.

Além da eficiência dos marcadores RAPD para análise de diversidade genética, outros marcadores moleculares podem ser utilizados por serem mais informativos e complementarem as análises realizadas com RAPD. Para tal finalidade, destacam-se as sequências simples repetidas (SSR) e repetições entre sequências simples repetidas (ISSR).

Os SSR ou microssatélites são um dos marcadores mais polimórficos encontrado no genoma de animais e plantas (SALLES et al., 2003). Isso se deve às suas características de natureza multialélica, herança co-dominante, facilidade de detecção pela PCR, abundância relativa e cobertura extensiva do genoma (PINTO, 2001). Os SSRs são pequenas sequências de DNA, constituídas de unidades repetidas de nucleotídeos (1-6 nucleotídeos, em *tandem*) encontradas em todos os genomas de procariotos e eucariotos. Estão presentes tanto em regiões codificadoras como não codificadoras e são geralmente muito polimórficas devido ao alto nível de variação no número de repetições (ZANE et al., 2002). Essas variações decorrem do fato dos microssatélites estarem localizados em regiões que sofrem taxas de mutação muito maiores que nas sequências de cópia única. Os alelos diferem por apresentarem

números distintos de repetições, oriundos de *crossing over* desigual durante a meiose ou do deslizamento da DNA polimerase durante a duplicação da molécula (PINTO, 2001).

Embora as sequências de microssatélites variem, as sequências adjacentes podem ser únicas e conservadas no mesmo loco entre diferentes indivíduos da mesma espécie. Assim, pode-se desenhar um oligonucleotídeo específico para as sequências adjacentes a um microssatélite, de forma que, por PCR será possível amplificar esse loco em diferentes genótipos. Como o número de unidades repetidas em tandem em um microssatélite pode ser variável entre diferentes genótipos, os produtos da amplificação dos diferentes indivíduos mostram um polimorfismo do tamanho do fragmento amplificado (CONTE, 2004).

Devido ao alto grau de polimorfismo, os microssatélites têm sido empregados em diferentes situações da área vegetal, no entanto seu uso em espécies nativas é limitado devido às escassas informações sobre sequências de DNA de espécies tropicais (ALMEIDA, 2006). Além disso, os microssatélites proporcionam uma das maneiras mais práticas e poderosas atualmente disponíveis para acessar a diversidade genética em espécies ameaçadas de extinção (FRANKHAM et al., 2004), sendo; portanto, ferramenta de grande auxílio em estudos de genética da conservação de espécies.

Por sua vez, os ISSRs representam uma técnica simples, rápida, eficiente e de alta reprodutibilidade. Os produtos amplificados variam de 200-2000 pares de bases (pb) e são sensíveis para detecção tanto por eletroforese em gel de agarose como em gel de poliacrilamida (REDDY, 2002).

Pelo fato dos ISSRs serem altamente polimórficos, são úteis em estudos de diversidade genética, filogenia, caracterização molecular, mapeamento e biologia evolutiva (ALMEIDA, 2006). Nesse método, os microssatélites são utilizados como *primers* para amplificar as regiões internas dos SSRs. A técnica é baseada em PCR e envolve a amplificação do segmento de DNA presente a uma distância amplificável entre dois microssatélites idênticos, orientados em direções opostas. São utilizados microssatélites de 16 a 25 pb como um oligonucleotídeo iniciador único. Esses oligonucleotídeos podem anelar em qualquer ponto ou ser ancorados com oligonucleotídeos degenerados que anelam em pontos específicos. O ancoramento dos oligos pode ser na região 5' ou 3', com 1 a 4 bases degeneradas da região

flanqueada pelas sequências SSRs. Os marcadores ISSRs apresentam alta reprodutibilidade devido ao uso de sequências longas (16-25 pb), quando comparadas ao RAPD e permite o uso de altas temperaturas de anelamento (REDDY et al., 2002). A limitação do ISSR, assim como o RAPD, é que a maioria dos fragmentos é de expressão dominante. No entanto, recentes estudos realizados com esses marcadores em populações naturais têm demonstrado sua natureza hipervariável e seu potencial uso em estudos de vários níveis populacionais (XIAO et al., 2004).

Para bromélias, alguns marcadores SSR e ISSR foram obtidos, permitindo seu uso em estudos de diversidade genética, entretanto esses estudos se restringem a poucas espécies, como *Pitcairnia geyskessy* (SARTHOU et al., 2003), *Pitcairnia albiflos* (PAGGI et al., 2008) e *Tillandsia fasciculata* e *Guzmania monostachya* (BONEH et al., 2003). O nível de polimorfismo gerado pelos microsatélites foi útil para a comparação da estrutura genética de populações fragmentadas dessas espécies.

Vários trabalhos têm mostrado a possibilidade de transposição de marcadores moleculares. Os marcadores microsatélites podem ser transferidos entre espécies próximas e até mesmo entre gêneros próximos, reduzindo consideravelmente os custos de sua utilização (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Boneh et al. (2003) sugerem que os microsatélites desenvolvidos por eles para os gêneros *Tillandsia* e *Guzmania* podem ser aplicados para outras espécies dentro do gênero e até mesmo em gêneros próximos. Almeida (2006) validou a transferibilidade de marcadores microsatélites desenvolvidos para *Pitcairnia geyskessi* (SARTHOU et al., 2003), *Tillandsia fasciculata* e *Guzmania monostachya* (BONEH et al., 2003) e ISSRs selecionados para *Sphagnum angermanicum* e *Pogonatum dentatum* para a bromélia *Aechmea fulgens*, obtendo resultados satisfatórios para sua caracterização.

Para qualquer espécie, a estimativa do grau de variabilidade genética é um dos fatores que mais influencia na tomada de decisões para implementação de programas de conservação, uma vez que muitos desses programas visam manter ou ampliar os níveis existentes de polimorfismo genético (JAMES; ASHBURNER, 1997; BEKESSY et al., 2002). Dessa forma, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de pesquisas sobre diversidade genética em populações naturais. Além disso, até o momento, nenhuma pesquisa foi publicada sobre a diversidade genética de *P. flammea*.

Portanto, neste trabalho, objetivou-se estudar a diversidade genética em populações naturais de *P. flammea* por meio de marcadores RAPD, o que poderá fornecer subsídios para posteriores estudos de conservação, bem como validar a transferibilidade de marcadores SSR e ISSR em *P. flammea*.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Coletas em campo

Foram identificados três locais de coleta, sendo dois no Distrito de Burarama, Município de Cachoeiro de Itapemirim e um no Município de Alegre, ambos no Sul do Estado do Espírito Santo (Figura 1).

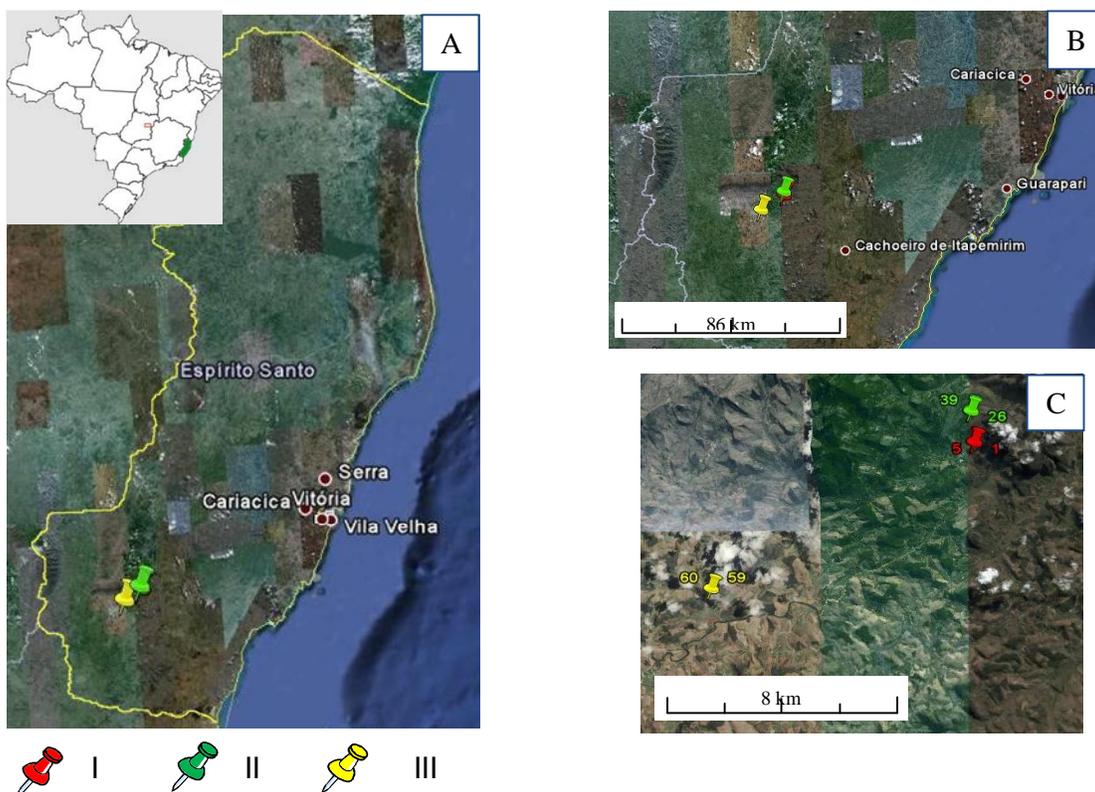


Figura 1 – Localização geográfica da região estudada: Mapa do Espírito Santo (A); Mapa com enfoque para a Região Sul do Espírito Santo (B); Mapa indicando os Locais I, II e III (C)

O espécime-testemunho de *P. flammea* Lindley foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o número CESJ 55670.

2.4.2 Critérios gerais da amostragem

Apesar das espécies contempladas neste trabalho apresentarem hábito clonal, distribuindo-se em touceiras, a reprodução sexuada via sementes também pode ser observada no campo. Foram estabelecidos no mínimo dois metros de distância entre cada indivíduo coletado, para que indivíduos pertencentes à mesma touceira não fossem amostrados. No total, 51 indivíduos foram amostrados, numerados de 1 a 21 os indivíduos do Local I, de 22 a 40 os indivíduos do Local II e de 41 a 51 os indivíduos do Local III (Tabela 1).

Tabela 1 – Populações amostradas com os respectivos códigos e localização geográfica

Locais	Código	Latitude	Longitude	Nº de indivíduos
Burarama 1	Local I	20°40'43.10"S	41°20'40.59"W	21
Burarama 2	Local II	20°41'47.89"S	41°23'05.66"W	19
Alegre	Local III	20°44'41.75"S	41°25'57.94"W	11
Total				51

Conforme mapeamento realizado (comunicação pessoal)¹, as coletas de indivíduos ocorreram em expedições a remanescentes florestais localizados em áreas públicas. Foram visitados locais com vegetação praticamente inalterada até pontos com diferentes graus de perturbação antrópica.

2.4.3 Estabelecimento de métodos para conservação de material vegetal e extração de DNA

Folhas de um espécime de *P. flammea* mantido em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo foram utilizadas para estabelecer os melhores métodos de conservação do material vegetal e de extração de DNA.

¹FARIA, A. P. G. Bromeliaceae no Sul do Espírito Santo. 2007

As folhas foram coletadas inteiras, lavadas em água corrente, limpas com álcool 70%, enxaguadas em água destilada e então segmentadas. Para verificar a influência do método de conservação do material vegetal sob o processo de extração de DNA (qualidade, concentração e duração do processo), foram realizados ensaios nas seguintes condições: material fresco ou armazenado por 24 horas, 48 horas ou 72 horas em geladeira (4 °C) ou congelador (-18 °C). Todas as combinações de conservação foram avaliadas com dois métodos de extração de DNA: Doyle e Doyle (1990) – “protocolo longo: aproximadamente 60 horas” e Doyle e Doyle (1990) modificado por Abdelnoor et al. (1995) – “protocolo curto: aproximadamente 36 horas”. O protocolo Doyle e Doyle (1990) modificado apresenta uma etapa de precipitação por uma noite (5M de NaCl₂ e isopropanol gelado) a menos que o original, tendo; portanto, menor duração.

2.4.4 Extração de DNA

Nas expedições ao campo, as folhas foram coletadas inteiras, embaladas em papel alumínio e mantidas em caixa de isopor com gelo. No laboratório, foi realizada a limpeza das folhas conforme mencionado anteriormente. Após secas, a extração de DNA genômico foi realizada conforme o protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado (36 horas). Cerca de 200 a 300 mg de folhas foram trituradas na presença de N₂ líquido, sendo o pó resultante transferido para microtubos identificados. Após a adição de 700 µL de tampão de extração constituído de 2% v/v de CTAB, 1,4 mol/L de NaCl₂, 20 mmol/L de EDTA, 100 mmol/L de Tris-HCl a pH 8,0; 2% p/v de Polivinilpirrolidona sólido e 0,2% v/v de β-mercaptoetanol, os tubos foram levados ao vórtex por aproximadamente 20 segundos e encubados em banho-maria a 65 °C por aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 18625 g em centrífuga Heitich Zentrifugen MIKRO 200 e o sobrenadante, transferido para novos tubos. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram suavemente invertidos e centrifugados por 5 minutos a 18625 g. A fase superior foi transferida para outros tubos e adicionou-se 5 M de NaCl₂ (proporção 1:1 de NaCl₂:sobrenadante) e isopropanol gelado (proporção 2:3 de

isopropanol:sobrenadante). Os tubos foram suavemente agitados por algumas vezes e incubados a - 20 °C por uma noite. Após esta etapa, os tubos foram levados a centrífuga por 10 minutos a 18625 g, sendo o sobrenadante removido e o precipitado lavado uma vez com etanol 70%, outra vez com etanol 95% e seco a temperatura ambiente. Esse precipitado foi ressuscitado em 0,2 ml de TE (10 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de EDTA a pH 8.0), contendo RNase na concentração final de 40 µg/mL e incubado em banho-maria a 37 °C por uma hora e meia, sendo depois levados à centrífuga. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi lavado uma vez em álcool 70% e em álcool 95%, seco à temperatura ambiente e em seguida ressuscitado em TE.

A quantificação de DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida para comparação (DNA de vetor lambda a 25, 50 e 75 ng/µL).

2.4.5 Análise dos marcadores moleculares RAPD

Foram testados 96 *primers* RAPD da empresa Operon Technologie, dentre os quais 36 foram pré-selecionados por gerarem produto de amplificação em *P. flammea*. Destes, oito foram utilizados na avaliação da diversidade entre os genótipos por apresentarem o maior número de bandas polimórficas (Tabela 2). A pré-seleção foi realizada em uma amostra de oito indivíduos escolhidos aleatoriamente.

Tabela 2 – Sequências de *primers* RAPD utilizados para análise de diversidade genética de *P. flammea*

Primer	Seqüências 5'-3'
OPAL 06	AAGCGTCCTC
OPW 20	TGTGGCAGCA
OPAH 13	TGAGTCCGCA
OPAL 17	CCGCAAGTGT
OPC 05	GATGACCGCC
OPE 14	TGCGGCTGAG
OPAT 14	GTGCCGCACT
OPQ 04	AGTGCGCTGA

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 μL , contendo 2,8 mM de MgCl_2 , 10 mM/50 mM de Tris/KCl pH 8.3, 0,1 mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,4 μM de *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Thechne TC 412) nas seguintes condições: 3 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos constituídos por três etapas: a) 30 segundos a 94 °C, b) 30 segundos a 35 °C e c) 1 minuto a 72 °C, e uma etapa final de 3 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo 0,02 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de brometo de etídeo em tampão SB 1X (0,04% v/v de NaOH e 0,25% v/v de ácido bórico), a 110 volts por aproximadamente três horas. Terminada a corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, pelo Sistema de Fotodocumentação L PIX HE da Loccus Biotecnologia®.

Os resultados referentes às bandas polimórficas detectadas entre os indivíduos foram transformados em dados binários, atribuindo-se 1 para presença e 0 para ausência de bandas.

2.4.6 Análises estatísticas computacionais

Os programas PopGene versão 1.32 (YEH; BOYLE, 1997) e GENES (CRUZ, 2008) foram usados para estimar os parâmetros genéticos e realizar os agrupamentos inter e intrapopulacionais.

O programa Arlequin 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000) foi utilizado para determinar a diferenciação genética por meio das estatísticas de Whright (WEIR; COCKERHAM, 1984) aplicadas na construção do dendrograma interpopulacional através do método UPGMA (Método de Agrupamento usando Média Aritmética Não Ponderada) no Programa MEGA 4.0.

Os dendrogramas intrapopulacionais foram gerados a partir da matriz de complemento dos coeficientes de dissimilaridade genética de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA no programa GENES (CRUZ, 2008).

Para a verificação da estruturação das populações estudadas foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA), conforme descrito por Excoffier *et al.* (1992), usando o programa Arlequin versão 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

A diversidade genética molecular foi avaliada através do índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') (LEWONTIN, 1972) e pelo índice de diversidade genética de Nei (1973). O índice foi calculado para cada loco independente e para cada população, para que se pudesse verificar se há relação entre o tamanho da amostra para cada população e a variabilidade genética molecular encontrada. O H' pode variar de 0 a 1 e quanto mais próximo o valor for de zero, mais baixas são as estimativas de diversidade (SHANNON, 1948).

A variância genética molecular foi analisada entre e dentro de populações.

2.4.7 Transferibilidade de primers SSR e ISSR

Para a validação da transferibilidade de marcadores moleculares SSR e ISSR, foram utilizados 10 genótipos de *P. flammaea* pertencentes ao Local de coleta III. Os primers ISSR utilizados foram selecionados por Almeida (2006) de um conjunto produzido pela University of British Columbia, Vancouver, Canadá para *Sphagnum angermanicum* e *Pogonatum dentatum*, enquanto o SSR foi desenvolvido para *Pitcairnia geyskessi* por Sarthou et al. (2003). A tabela 3 apresenta as informações referentes aos marcadores utilizados.

Tabela 3 – Primers SSR e ISSR utilizados para a transposição em *P. flammaea*

Primer	Marcador	Referência	Seqüência (5' – 3')
Pit 5	SSR	(SARTHOU et al., 2003)	F:TTGAGCCATGAACAATAGGG R:AGAATTCTAGTGGCAGTCCT C
UBC808	ISSR	(ALMEIDA, 2006)	(AG)8C
UBC810	ISSR	(ALMEIDA, 2006)	(GA)8T
UBC890	ISSR	(ALMEIDA, 2006)	VHV(GT)7

As reações para a amplificação dos primers ISSR foram realizadas em um volume total de 25 μ L, contendo 2 mM de $MgCl_2$, 10mM/50mM de Tris/KCl pH 8.3, 0,1mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,2 μ M de primer, 1 unidade de Taq polimerase e 50 ng de DNA (ALMEIDA, 2006).

As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos constituídos por três etapas: a) 30 segundos a 94 °C, b) 30

segundos variando de 45 a 50 °C dependendo do *primer* utilizado e c) 1 minuto a 72 °C, com uma etapa final de 7 minutos a 72 °C.

As reações para a amplificação dos *primers* SSR foram realizadas em um volume total de 15 µL, contendo 2 mM de MgCl₂, 10mM/50mM de Tris/KCl pH 8.3, 0,1mM de cada nucleotídeo (dNTP), 0,2 µM de *primer*, 1 unidade de Taq polimerase e 50 ng de DNA, conforme Almeida (2006), com modificações.

As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 15 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos constituídos por três etapas: a) 1 minuto a 94 °C, b) 1minuto a 52 °C e c) 1 minuto a 72 °C, com uma etapa final de 7 minutos a 72° C.

Os fragmentos amplificados de ISSR e SSR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% e 2,5% respectivamente, contendo 0,02 uL.mL⁻¹ de brometo de etídio em tampão SB 1X (0,04% v/v de NaOH e 0,25% v/v de ácido bórico), a 110 Volts por aproximadamente três horas. Após a corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta utilizando o Sistema de Fotodocumentação L PIX HE da Loccus Biotecnologia®. Os géis foram analisados quanto ao número e tamanho de fragmentos amplificados e detecção de polimorfismos.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Métodos de conservação do material vegetal e extração de DNA

Os testes realizados para padronização do melhor método para conservação das folhas e extração de DNA mostraram que a utilização de folhas frescas proporcionou DNA de melhor qualidade, independente do método de extração utilizado (Figura 2). A baixa concentração de DNA extraído por amostra é reflexo da pequena quantidade de DNA nuclear que *P. flammea* apresenta, como será apresentado no Capítulo 3 deste trabalho. Ficou padronizada a utilização de folhas frescas para a extração de DNA de *P. flammea* e do protocolo Doyle e Doyle (1990), com modificações, por ser um protocolo (PT) de curta duração (36 h).

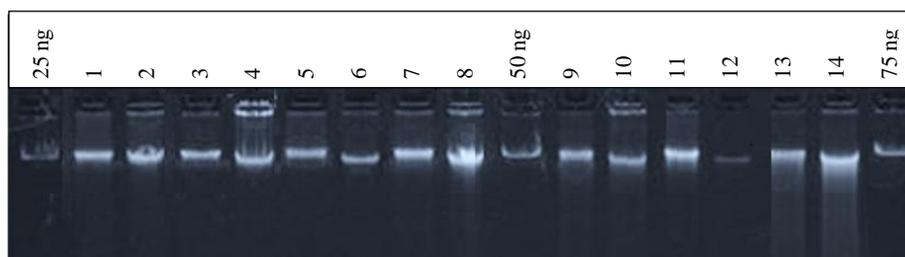


Figura 2 – Eletroforese para padronização de métodos de conservação de folhas e extração de DNA de *P. flammea*.

Folha fresca – PT curto; (2) folha fresca – PT longo; (3) geladeira 24h - PT curto; (4) geladeira 24h - PT longo; (5) geladeira 48h - PT curto; (6) geladeira 48h - PT longo; (7) geladeira 72h - PT curto; (8) geladeira 74h - PT longo; (9) congelador 24h - PT curto; (10) congelador 24h - PT longo; (11) congelador 48h - PT curto; (12) congelador 48h - PT longo; (13) congelador 72h - PT curto; (14) congelador 72h - PT longo; 25 ng, 50 ng e 75 ng – marcador de concentração.

2.5.2 Diversidade genética em populações naturais de *P. flammea*

2.5.2.1 Análise do polimorfismo detectado por marcadores RAPD

Os 8 *primers* RAPD utilizados geraram um total de 55 bandas das quais 41 foram polimórficas, representando um total de 74,5% de polimorfismo. Os fragmentos amplificados variaram de 700 a 1750 pb (Tabela 4).

Tabela 4 – *Primers* RAPD utilizados, respectivos número de fragmentos amplificados, número de fragmentos polimórficos e porcentagem de polimorfismo por *primer* produzido nos indivíduos de *P. flammea*

<i>Primer</i>	Nº de fragmentos	Nº fragmentos polimórficos	Polimorfismo (%)
OPAL 06	10	8	80
OPW 20	6	6	100
OPAH 13	8	8	100
OPAL 17	10	4	40
OPC 05	5	3	60
OPE 14	5	3	60
OPAT 14	5	3	60
OPQ 04	6	6	100
Total	55	41	74,5

Em trabalhos realizados com outras espécies da família Bromeliaceae, foi verificada grande variação em relação ao número de bandas polimórficas amplificadas por RAPD e altas taxas de polimorfismo.

Chen et al. (2002) avaliaram a similaridade genética com marcadores RAPD entre dezoito acessos de sete gêneros de Bromeliaceae, sendo seis gêneros de espécies ornamentais – *Cryptanthus*, *Dyckia*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Tillandsia* e *Vriesea*. Os resultados mostraram que 30 marcadores foram úteis para discriminação do gênero e espécies, especialmente para espécies com alta similaridade morfológica.

Costa et al. (2002) caracterizaram geneticamente *Ananas erectifolius* por meio de sete *primers* RAPD, que geraram 104 bandas, das quais 76% foram polimórficas.

Pereira e Kerr (2001) analisaram 12 genótipos de abacaxizeiro por meio de 11 *primers* RAPD e obtiveram 79 bandas polimórficas.

Pamponét et al. (2008) estudaram populações de *Lymania azurea* (Bromeliaceae) com 10 *primers* RAPD e obtiveram 48 bandas polimórficas, demonstrando que dos 19 indivíduos amostrados apenas 2 representavam o mesmo genótipo. Os autores concluíram que a técnica permitiu verificar uma variabilidade anteriormente subestimada por se tratar de uma espécie de hábito clonal.

Silveira et al. (2009) utilizaram 36 *primers* RAPD que geraram 501 bandas, sendo 467 polimórficas, para o estudo de diversidade genética de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae).

Cavallari (2006) utilizou cinco *primers* RAPD para três espécies do gênero *Encholirium* (Bromeliaceae) e conseguiu os seguintes resultados: para *E. biflorum* 58 bandas, destas 53 polimórficas, para *E. pedicellatum* obteve 59 bandas, destas 53 polimórficas e para *E. subsecundum* obteve 60 bandas e todas foram polimórficas.

2.5.2.2 Estrutura genética entre e dentro das populações

Os resultados observados para a porcentagem de bandas polimórficas, bem como o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (I) e a Diversidade Genética de Nei (h), indicaram que a maior diversidade genética molecular é observada entre os indivíduos amostrados da população na Localidade III (Tabela 5). Nesse caso, o Índice de Nei (h)

foi em média 0,334, o Índice de Shannon 0,489 e o número de loci polimórficos 35, com 85,37% de porcentagem de polimorfismo/loci.

Tabela 5 – Variação gênica interpopulacional segundo Diversidade Genética de Nei (1987) e Índice de Shannon-Wiener (SHANNON, 1948)

Local de coleta	Tamanho da amostra	h	I	Nº loci polimórficos	% loci polimórficos
I	21	0,216±0,195	0,330±0,271	30	73,17%
II	19	0,242±0,191	0,369±0,263	33	80,49%
III	11	0,334±0,170	0,489±0,236	35	85,37%

* h = Diversidade Genética de Nei; * I = Índice de Shannon-Wiener

Ao analisar isoladamente as amostras de indivíduos coletados das populações de *P. flammea* em cada localidade, foram observados valores de I iguais a 0,3304, 0,3691 e 0,4897, para os Locais de coleta I, II e III, respectivamente (Tabela 5).

Com relação aos resultados da AMOVA, do total da variância genética molecular encontrada, 69,18% se deve às diferenças entre indivíduos dentro das populações e 30,82% é atribuída às divergências entre as 3 populações amostradas (Tabela 6). Isso nos permite afirmar que a distância de 2 metros utilizada nas coletas dos indivíduos foi suficiente para evitar que indivíduos geneticamente idênticos fossem amostrados, uma vez que a porcentagem de loci polimórficos variou entre 70 e 85% nas populações. Deve ser ressaltado que pelo fato de *P. flammea* não ter sido domesticada foi possível encontrar polimorfismos com um número relativamente pequeno de *primers*.

Tabela 6 - Resultado da AMOVA para *P. flammea* ocorrente nos três locais de coleta analisada com marcadores RAPD

Fonte de Variação	GL	SQ	CV	V T (%)	Valor de P
Entre populações	2	80,648	2.177	30.82	<0,000
Dentro de populações	48	234.607	4.888	69.18	
Total	50	315.255	7.065		

Valores de Grau de Liberdade (GL), Soma dos Quadrados (SQ), Componente de Variância (CV), Variância Total (VT) e valor de P são as probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1000 permutações ao acaso.

Silveira et al. (2009) também encontraram resultados similares em populações de *Neoglaziovia variegata* estudadas no Estado da Bahia. Da variação total estimada, 56,47% foi explicada pela variação entre indivíduos dentro de cada agrupamento estudado nos municípios de Guanambi, Juazeiro e Valente. Entre os três municípios, a variação foi de 17,41% e a variação entre os agrupamentos foi de 26,12%. Foi possível concluir que existe variabilidade genética entre e dentro das populações de *N. variegata*.

Cavallari et al. (2006) também encontraram resultados semelhantes em populações de *E. subsecundum*, onde a maior variação percentual (84,38%) foi atribuída às diferenças entre indivíduos dentro dos diferentes agrupamentos amostrados. Ao analisar a variabilidade genética entre esses agrupamentos, obtiveram 1,10% de variação. Quando analisaram a variação total, obtiveram 14,52% de variação. Para *E. biflorum*, a variabilidade genética foi de 16,06% entre os agrupamentos e 83,94% dentro dos agrupamentos. Para *E. pedicellatum*, a variação entre os agrupamentos foi de 8,44%, estando a maior parte da variação dentro dos agrupamentos (91,56%). A tabela 7 mostra os resultados das diferentes medidas de variabilidade genética utilizadas para estimar o nível de polimorfismo das populações e inferir sobre a sua estrutura genética.

Tabela 7 – Diversidade genética molecular para os 51 indivíduos amostrados de *P. flammea* segundo Nei (1987)

	h	I	Ht	Hs	Gst	Nm
Média	0,3169	0,4837	0,3451	0,2644	0,2340	1,6372
Desvio padrão	0,1355	0,1704	0,0166	0,0151		
Nº de loci polimórficos	40					
Porcentagem de loci polimórficos	97,56%					

h = diversidade genética de Nei (1973); I = Índice de Shannon-Wiener; Ht = diversidade genética total; Hs = diversidade intrapopulacional; Gst = variação genética entre populações, se igual a zero indica que as populações são idênticas; Nm = estimativa do fluxo gênico a partir de Gst [$Nm = 0.5 (1-Gst)/Gst$] (Nei, 1973)

Do total de 40 *loci* RAPD que se mostraram polimórficos, foi gerado um percentual de polimorfismo igual a 97,56%, sugerindo que esse número de marcas foi suficiente para amostrar a diversidade genética molecular de *P. flammea* nas regiões de estudo.

A diversidade genética total de 0,3451 (Ht), o valor médio da diversidade intrapopulacional (Hs) de 0,2644 e a variação genética entre populações, $G_{st}=0,2340$, indicaram que as populações são próximas geneticamente.

Durante as coletas no campo, foi observada constante presença de plântulas e plantas jovens, o que sugere que a reprodução sexuada com produção de sementes em *P. flammea* é um evento comum, como confirmado por Wendt et al. (2002).

De acordo com Hamrick e Godt (1983), plantas preferencialmente autógamas apresentam populações geneticamente mais divergentes, sendo essas diferenças responsáveis por aproximadamente 50% da variância genética molecular total. Segundo Wendt et al. (2002), *P. flammea* é predominantemente autopolinizada em populações naturais, sendo esse o mecanismo mais importante de reprodução sexuada nesta espécie. Entretanto, no Estado do Rio de Janeiro, os índices de autofertilidade de *P. flammea* foram baixos, sugerindo maior dependência da atividade dos polinizadores (beija-flores), que foram observados visitando suas flores diariamente (WENDT et al., 2002).

Almeida (2006) utilizou marcadores SSR e ISSR e também obteve maior variação dentro das populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) de três fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco e também encontrou baixa diferenciação genética populacional, pois o fluxo gênico (Nm) estimado para esses marcadores foi de 2,5 e 5,7, respectivamente. Os resultados de alta diversidade intrapopulacional encontrados para *P. flammea* estão de acordo com vários estudos em populações naturais de outras espécies vegetais (AULER et al., 2002; CONTE, 2003; CAVALLARI, 2004; MELO JUNIOR et al., 2004; XIAO et al., 2004; ZUCCHI, 2005; GUSSON, 2005; GALEUCHET et al., 2005).

O Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H') para *P. flammea* foi de 0,4837. Índices próximos foram encontrados por Cavallari (2004), sendo 0,401 para *E. subsecundum*, 0,322 para *E. biflorum* e 0,298 para *E. pedicellatum*.

Tanto Silveira et al. (2009) estudando *N. variegata*, quanto Cavallari (2006) estudando *Encholirium*, verificaram números elevados de genótipos diferentes nas populações estudadas, fato não esperado quando se considera a existência de reprodução assexuada, formação de densos agrupamentos e morfologia uniforme.

A figura 3 mostra o dendrograma das distâncias entre as populações de *P. flammea* analisadas. Podemos observar que dois grupos foram formados: Locais de coleta I e II e Local de coleta III.

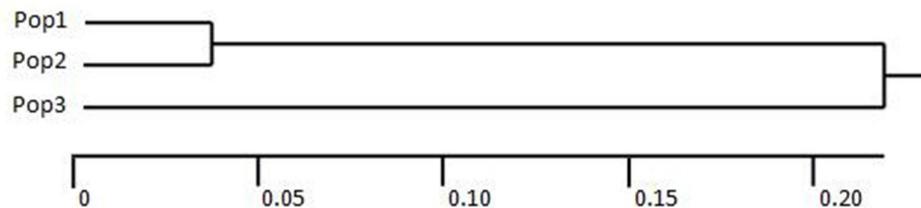


Figura 3 – Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA das populações de *P. flammea* a partir da diferenciação genética por meio das estatísticas de Wright (WEIR; COCKERHAM, 1984)

Os locais de coleta mais próximos geograficamente (I e II) estão agrupados e possuem menor distância genética entre si (0,04), o que poderia sugerir uma possível associação entre distância geográfica e distância genética. Os dendrogramas de Almeida (2006) também indicaram baixa divergência entre as populações estudadas, sugerindo que o fluxo gênico histórico entre as populações ainda é alto ou que a fragmentação não ocorreu a tempo suficiente para resultar em uma diferenciação evidente. Entretanto, neste estudo, acredita-se que a ocorrência de ambientes similares seja a melhor explicação para a seleção dos mesmos alelos nos grupos amostrados de *P. flammea*. Na tabela 8, são apresentados os valores das estimativas de identidade e distância genética, segundo Nei (1978), entre as 3 populações.

Tabela 8 – Estimativas de identidade e distância genética entre indivíduos das populações de *P. flammea* nos diferentes locais de coleta

Locais de coleta	Identidade genética	Distância genética
I e II	0,9714	0,0290
II e III	0,7788	0,2500
I e III	0,7829	0,2448

Foi observado que a maior identidade genética ocorreu entre os indivíduos dos Locais de coleta I e II (0,9714) e que estes mesmos grupos apresentam identidade genética semelhante quando comparadas ao Local de coleta III (0,7829 e 0,7788,

respectivamente). Portanto, os Locais de coleta I e II apresentam indivíduos que são muito próximos geneticamente, apresentando baixa distância genética (0,0290).

Os resultados deste trabalho mostraram que a diversidade genética foi maior dentro das populações de *P. flammea* e que a população do Local III está geneticamente mais distante em relação às populações dos Locais I e II (Tabela 8). Assim, podemos sugerir que a população do Local III, que apresenta maior variação genética, representaria melhor a diversidade de *P. flammea*, sendo; portanto, a prioritária em trabalhos de conservação dessa espécie, já que as populações estudadas não se encontram em Unidades de Conservação, tornando-se alvo constante de ações antrópicas e de extrativismo.

2.5.2.3 Estrutura genética dentro das populações

A análise simultânea de agrupamento dos 51 indivíduos amostrados indicou os genótipos que representam a maior parte da variabilidade genética dentro de cada população, o que seria essencial para o estabelecimento da conservação *ex situ*, como a formação de bancos de germoplasma.

Assim, na Tabela 09 e na Figura 04 estão apresentados os quatro grupos originados, considerando a distância de ligação de 68%. Os genótipos mais dissimilares foram 33 e 50 com coeficiente de dissimilaridade igual a 0,74, enquanto os menos dissimilares foram os genótipos 35 e 37 com dissimilaridade igual a 0,08. É possível observar que todos os indivíduos amostrados nas populações dos Locais I e II foram agrupados, enquanto os indivíduos do Local III, com exceção do indivíduo 44, mantiveram-se em outro agrupamento. Esses resultados confirmam os agrupamentos encontrados nas análises de Local de coleta.

Tabela 9 – Agrupamentos dos 51 indivíduos de *P. flammea* a partir do dendrograma obtido pelo complemento do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA

Agrupamentos	Indivíduos
Grupo 1	35, 37, 30, 26, 38, 39, 1, 2, 8, 34, 36, 16, 20, 17, 21, 27, 14, 15, 19, 22, 6, 18, 29, 33, 28, 40, 44, 5, 4, 31, 7, 10
Grupo 2	23, 24, 11, 12, 13
Grupo 3	3, 32, 9
Grupo 4	25, 51, 49, 50, 42, 43, 45, 47, 46, 41, 48

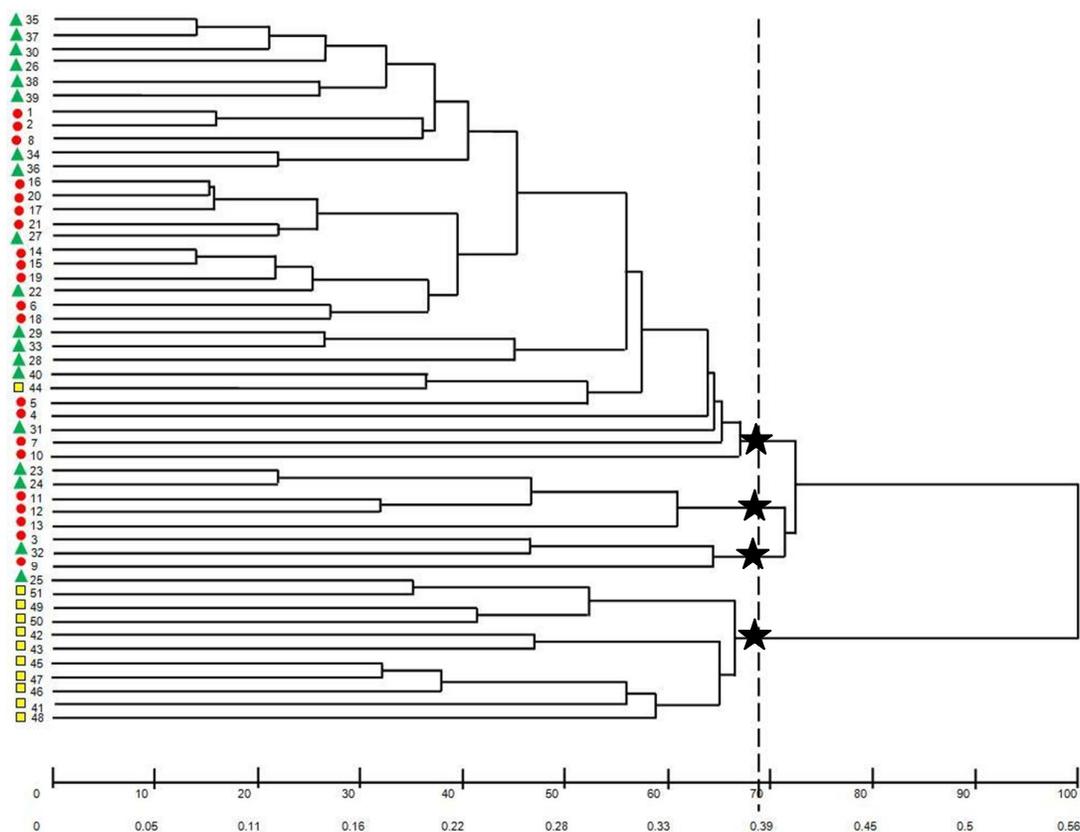


Figura 4 – Dendrograma da análise simultânea de agrupamento dos 51 indivíduos amostrados: agrupamentos indicados por estrelas, Local de coleta I indicado por círculos vermelhos, Local de coleta II indicado por triângulos verdes, Local de coleta III indicado por quadrados amarelos, e linha tracejada representando o corte no dendrograma em aproximadamente 68%.

Também foi analisada a ocorrência de variação genética entre indivíduos dentro de cada um dos locais de coleta. Ao analisar o Local I, foi verificada a formação de cinco agrupamentos (Tabela 10), considerando a distância de ligação de 68%. Os indivíduos mais indicados para a conservação *ex situ* seriam 13 e 8 com dissimilaridade igual a 0,708. Os indivíduos com menor dissimilaridade genética foram 14 e 5 com coeficiente igual a 0,095 (Figura 5).

Tabela 10 – Agrupamentos dos 21 indivíduos da população de *P. flammea* do Local de coleta I, a partir do dendrograma obtido pelo complemento do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA

Agrupamentos	Indivíduos
Grupo 1	14, 15, 19, 6, 18, 16, 20, 17, 21, 1, 2, 8, 11, 12, 4
Grupo 2	5, 9
Grupo 3	3, 7
Grupo 4	10
Grupo 5	13

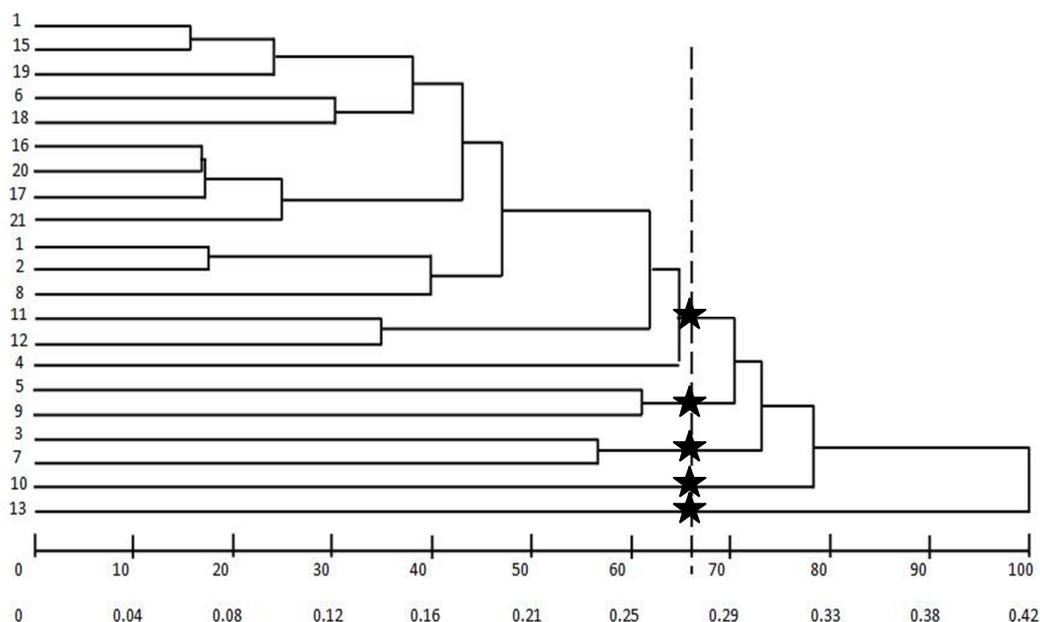


Figura 5 – Dendrograma da população de *P. flammea* no Local I: agrupamentos indicados por estrelas, e linha tracejada representando corte no dendrograma em aproximadamente 68%.

Para o Local de coleta II, houve a formação de cinco agrupamentos (Tabela 11), de acordo com a distância de ligação considerada (68%). A maior dissimilaridade foi encontrada entre os indivíduos 25 e 28 com coeficiente igual a 0,741, enquanto os menos dissimilares foram 14 e 16 com coeficiente igual a 0,105 (Figura 6).

Tabela 11 – Agrupamentos dos 19 indivíduos da população de *P. flammea* do Local de coleta II, a partir do dendrograma obtido pelo complemento do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA

Agrupamentos	Indivíduos
Grupo 1	35, 37, 30, 26, 38, 39, 40, 34, 36, 22, 29, 33, 27, 28
Grupo 2	31
Grupo 3	23, 24
Grupo 4	32
Grupo 5	25

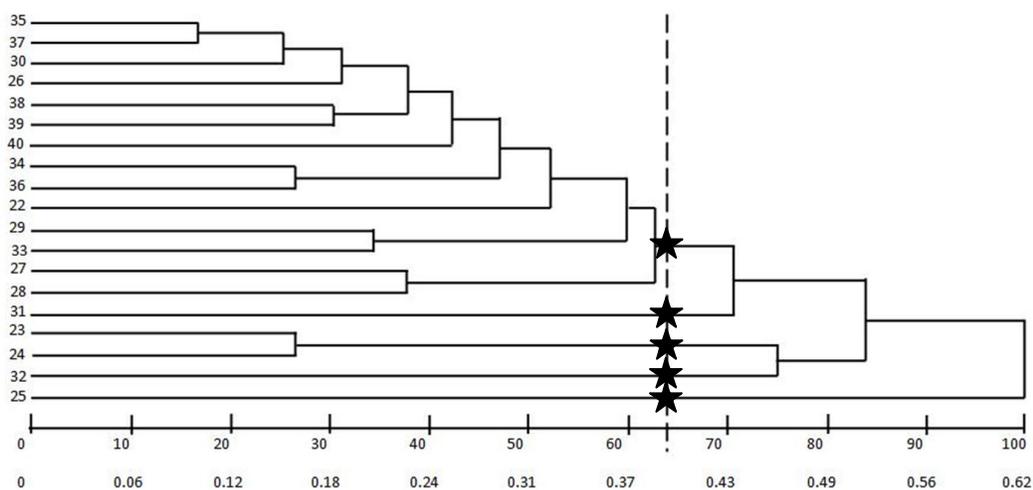


Figura 6 – Dendrograma da população de *P. flammea* no Local II: agrupamentos indicados por estrelas e linha tracejada representando corte no dendrograma em aproximadamente 64%.

Para o Local de coleta III, seis agrupamentos foram formados (Tabela 12), considerando uma distância de ligação de 68%. A maior dissimilaridade foi encontrada entre os genótipos 44 e 50 com coeficiente igual a 0,688, enquanto os menos dissimilares foram 45 e 47, com coeficiente igual a 0,222 (Figura 7).

Tabela 12 – Agrupamentos dos 11 indivíduos da população de *P. flammea* do Local de coleta III, a partir do dendrograma obtido pelo complemento do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA

Agrupamentos	Indivíduos
Grupo 1	45, 47, 46
Grupo 2	41
Grupo 3	48
Grupo 4	49, 50, 51
Grupo 5	42, 43
Grupo 6	44

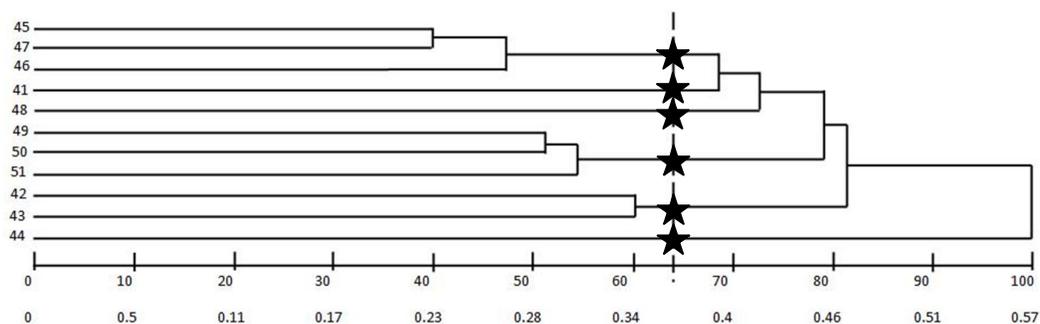


Figura 7 – Dendrograma da população de *P. flammea* no Local III: agrupamentos indicados por estrela, e linha tracejada representando corte no dendrograma em aproximadamente 64%.

A distância de 2 metros entre os indivíduos coletados em campo foi eficiente, já que considerando o agrupamento dos 51 indivíduos, os indivíduos 33 e 35, fisicamente próximos, estão entre os mais e entre os menos dissimilares, respectivamente. A distância física respeitada proporcionou a coleta tanto de indivíduos próximos quanto distantes geneticamente. O mesmo aconteceu no Local de coleta II, com os genótipos 33 e 35, e para o Local de coleta III com os indivíduos 44 e 45.

Portanto, na região amostrada neste trabalho, *P. flammea* apresentou tanto variação inter quanto intrapopulacional, sendo a maior diferenciação genética encontrada dentro da população do Local de coleta III.

2.5.3 Transferibilidade de primers SSR e ISSR para *P. flammea*

Foram utilizados 3 marcadores ISSR e 1 SSR. O número de bandas amplificadas e polimórficas, bem como o tamanho em pb estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – *Primers* utilizados para a transposição em *P. flammea* com os respectivos números de fragmentos amplificados, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados

<i>Primers</i>	Marcador	Bandas amplificadas	Bandas polimórficas	Tamanho (pb)
Pit 5	SSR	1	0	320
UBC808	ISSR	4	1	650 a 2000
UBC810	ISSR	6	3	600 a 950
UBC890	ISSR	7	2	400 a 1200

Todos os *primers* utilizados revelaram polimorfismo (Figuras 8, 9 e 10), com exceção de Pit 5 (Figura 11).

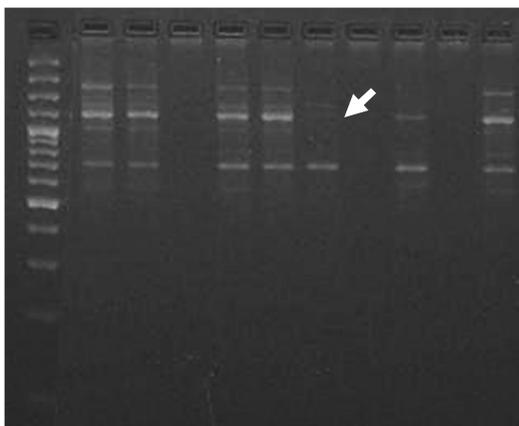


Figura 8 – Transposição do *primer* UBC808 em *P. flammea*: da esquerda para direita: – marcador de peso molecular (100 pb) e indivíduos de 1 a 10 do Local de coleta III; seta indica polimorfismo.

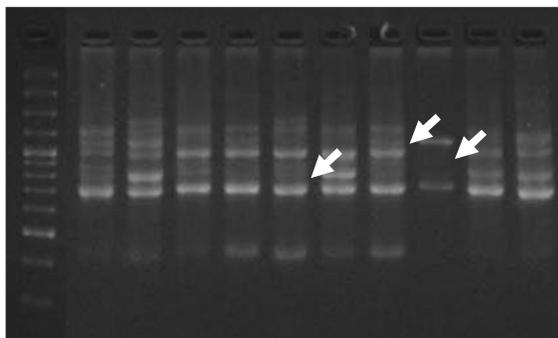


Figura 9 - Transposição do *primer* UBC810 em *P. flammea*: da esquerda para direita: marcador de peso molecular (100 pb) e indivíduos de 1 a 10 do Local de coleta III; setas indicam polimorfismos.

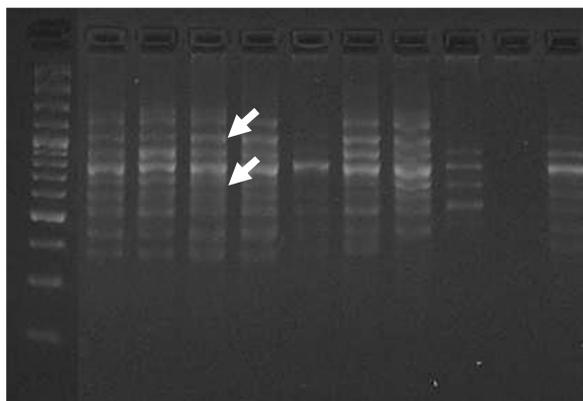


Figura 10 - Transposição do *primer* UBC890 em *P. flammea*: da esquerda para direita: marcador de peso molecular (100 pb) e indivíduos de 1 a 10 do Local de coleta III; setas indicam polimorfismos.

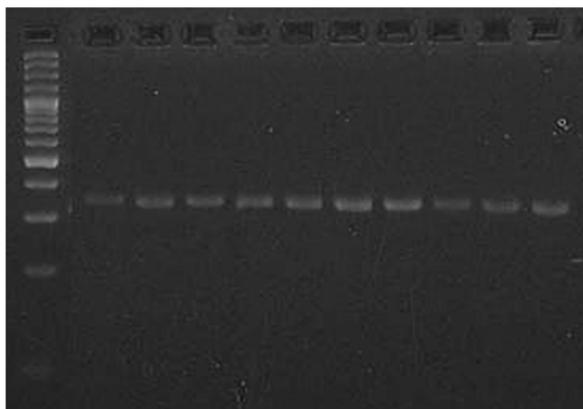


Figura 11 - Transposição do *primer* Pit 5 em *P. flammea*: da esquerda para direita: marcador de peso molecular (100 pb) e indivíduos de 1 a 10 do Local de coleta III.

Uma justificativa para ausência de trabalhos envolvendo SSR e ISSR em bromélias está associada ao tempo e aos gastos para o desenvolvimento desses marcadores. A transposição de *primers* descritos para outras espécies em bromélias é uma estratégia para minimizar os custos relacionados ao uso desses marcadores.

A transferibilidade dos marcadores foi validada entre os gêneros *Guzmania*, *Aechmea* e *Pitcairnia*, bem como entre as espécies *P. geyskessi* e *P. flammea* pela amplificação dos loci. Houve a transferibilidade de 100% dos *primers* ISSR avaliados, assim como para o loco microssatélite avaliado.

Em *P. flammea*, o fragmento obtido para o marcador SSR (Pit 5) apresentou tamanho aproximado de 320 pb. Almeida (2006) obteve fragmentos variando de 110 a 450 pb para esse mesmo marcador. Em *P. geyskessi*, Sarthou et al. (2003) reportaram fragmentos com tamanho variando entre 320 e 346 pb.

Os fragmentos amplificados com *primers* ISSR apresentaram tamanhos variando entre 600 a 2000 pb em *P. flammea*. Almeida (2006) obteve fragmentos gerados pelos mesmos *primers* ISSR com tamanhos entre 350 a 2000 pb e polimorfismo de 94% para o *primer* 808 (17 bandas polimórficas de 18 amplificadas), 90% para o *primer* 810 (15 fragmentos polimórficos de 17 amplificadas) e 88% para o *primer* 890 (7 bandas polimórficas de 8 amplificadas).

Os resultados de transposição de marcadores SSR e ISSR mostram que marcadores desenvolvidos para outras espécies vegetais podem ser utilizados em estudos moleculares de *P. flammea*.

Assim, em estudos futuros com *P. flammea*, esses marcadores desenvolvidos para as espécies *Aechmea fulgens*, *Pitcairnia geyskessy*, *Sphagnum angermanicum* e *Pogonatum dentatum* poderão ser utilizados para a complementação de sua caracterização genética.

2.6 Conclusões

Marcadores moleculares RAPD foram eficientes para analisar a diversidade genética de *P. flammea* intra e interpopulacional, sendo a maior diversidade encontrada intrapopulacionalmente;

A distância genética entre os genótipos dos três locais de coleta foi pequena, sugerindo que a fragmentação ainda não causou consequências genéticas drásticas sobre as populações nos fragmentos estudados;

Entre os indivíduos das populações dos locais estudados, no Local III foi observada a maior variação genética encontrada para a espécie *P. flammea*, sendo preferencialmente escolhida para a realização de futuros trabalhos de conservação *in situ*;

Em estratégias de conservação *ex situ*, os indivíduos que melhor representam a variabilidade genética seriam: 33 e 50 considerando o agrupamento dos 51 indivíduos, 8 e 13 do Local de coleta I, 25 e 28 do Local de coleta II e 44 e 50 do Local de coleta III.

A transferibilidade dos marcadores SSR e ISSR identificados em *Aechmea fulgens*, *P. geyskessy*, *S. angermanicum* e *P. dentatum* foi validada em *P. flammea*. Esses marcadores constituem grande potencial para estudos de diversidade genética dessa espécie, assim como estudos de variabilidade interespecífica, filogenia e mapeamento genético moleculares, possibilitando a complementação do estudo de diversidade genética em *P. flammea* com menor custo e informação de grande confiabilidade devido à natureza desses marcadores.

2.7 Referências bibliográficas

ABDELNOOR, R.V.; BARROS, E.G. & MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 2, p. 265-273, 1995.

ALMEIDA, C. M. A. **Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

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

BEKESSY S. A., ALLNUTT T. R., PREMOLI A. C., LARA A., ENNOS R. A., BURGMAN M. A., CORTES M.; NEWTON A. C. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. **Heredity**, v. 88, p. 243–249, 2002.

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

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

BROWN, S.A. Genetic variation within and between some rare and common taxa of Cape Proteaceae and the implications for their conservation. Grahamstown, 1999. 169p. Tese (Doutorado) – Department of Botany, Faculty of Science, Rhodes University.

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). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 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.

CHEN, H. C.; SHII, C. T.; LIN, S. F.; CHIU, H. L.; CHUNG, J. P. Genetic relationship between ornamental bromeliads of Centric South America and commercial cultivars in Taiwan. **Journal of the Chinese Society for Horticultural Science**, v.48, n.3, p.201-210, 2002.

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

CONTE, R. ; NODARI, R. O. ; VENCOSKY, R. ; REIS, M. S. DOS . Genetic Diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity** (Edinburgh), England, v. 91, p. 401-406, 2003.

COSTA, M. R.; LAMEIRA, O. A.; YOSHINO, V. C. Caracterização genética do curauá (*Ananas erectifolius*) através de Marcadores RAPD. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.28-30, 2002.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: diversidade genética.** Viçosa: UFV, p. 278, 2008.

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

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

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

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. 2004. **A primer of conservation genetics.** Cambridge University Press, 220pp.

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**, New York: Oxford University Press, pp. 54-73.

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

GUSSON, E. ; Sebbenn, A. M. ; Kageyama, P. Y. . Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis** (IPEF), v. 67, p. 123-135, 2005.

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

HUFF, D.R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p. 927-934, 1993.

JAMES, E.A.; ASHBURNER, G.R. Intraspecific variation in *Astelia australiana* (Liliaceae) and implications for the conservation of this Australian species. **Biological Conservation**, v.82, p.253-261, 1997.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evol. Biol.**, v. 6, p. 381-398, p. 1972.

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

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceeding of National Academy of Science of USA**, v.70, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York. 1987.

PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; BERED, C.; CIDADE, F. W.; SOUSA, A. C. B.; SOUZA, A. P.; T.; WENDT, T.; LEXER, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 980-982, 2008.

PALACIOS, C.; GONZALES-CANDELAS, F. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). **Molecular Ecology**, v.6, p.1107-1121, 1997.

PAMPONÉT, V. C. C.; FONTOURA, T.; GAIOTTO, F. A. Diversidade clonal em populações de *Lymania azurea* (Bromeliaceae) detectada através de marcadores RAPD. In: **Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética**. Salvador, BA, 2008.

PEREIRA, C. D.; KERR, W. E. Divergência genética entre doze genótipos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L., Merrill.) estimada por análise de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.335-338, 2001.

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

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

ROSSETTO, M.; WEAVER, P. K. & DIXON, K. W. 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). **Molecular Ecology**, 4: 321-329.

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

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

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.000: a software for population data analysis (software)**. Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, 2000. Disponível em: <<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>>. Acesso em: 04 de jan de 2010.

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

SILVEIRA, D. G., AMORIM, E. P., JESUS, O. N. DE, SOUZA, F. V. D., PESTANA, K. N., SANTOS, V. J. DOS; SANTANA, J. R. F. de. **Variabilidade genética de populações naturais de caroá por meio de marcadores RAPD** . Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, p.283-290, 2009.

WADT, L. H. DE O.; EHRINGHAUS, C. ; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of Pimenta Longa genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 74-82, 2004.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WENDT T., CANELA M. B. F., KLEIN D. E. E RIOS R. I. Selfing facilitates reproductive isolation among sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 232, p. 201–212, 2002.

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 Res**, v.18, p.6531-6535, 1990.

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

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v. 129, p. 156-157, 1997.

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

ZUCCHI, M. I. ; PINHEIRO, J. B.; COELHO, A. S. G.; MORAIS, L. K. de ; COUTO, M. A.; CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia*

dysenterica DC in brazilian cerrado utilizing RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 975-980, 2005.

3 CAPÍTULO 2 – GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Pitcairnia flammea*

3.1 Resumo

NOGUEIRA, Ester Ujiie, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, março de 2010. **Germinação *in vitro* de sementes de *Pitcairnia flammea***. Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima.

A conservação *in vitro* oferece subsídios para manter a salvo recursos genéticos durante longo prazo e em pequeno espaço, mantendo-os livres de patógenos e adversidades ambientais. A conservação de espécies preconiza que a maior variabilidade genética seja preservada, sendo aconselhável a utilização de sementes. Devido à escassez de estudos básicos sobre a germinação *in vitro* de *P. flammea*, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo adequado para sua germinação *in vitro*. Frutos de indivíduos nativos de fragmentos de Mata Atlântica foram coletados e armazenados até sua secagem, sendo então submetidos à formação de um *bulk*. As sementes foram desinfestadas e inoculadas em quatro meios de cultivo: água+ágar, água+ vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), MS total e MS ½, combinados com 5 concentrações de GA₃: (0µM; 25 µM; 50 µM; 75 µM e 100 µM). O experimento foi avaliado durante 30 dias e mensurados os parâmetros: Porcentagem de Germinação (P%) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG). A interação entre os meios de cultivo e as concentrações de GA₃ utilizadas foram estatisticamente iguais para os parâmetros avaliados. A germinação iniciou-se, em média, aos 9 dias após a inoculação e a P% média foi de 95%, independente da constituição do meio de cultivo. A alta e rápida germinabilidade podem ser consequências do hábito terrestre de *P. flammea* e sua eficiência em obter nutrientes de ambientes pobres. O meio água-ágar sem GA₃ é o mais indicado para germinação da espécie.

3.2 Abstract

NOGUEIRA, Ester Ujii, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, In march 2010. ***In vitro* germination of seeds of *Pitcairnia flammea***. Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima.

The *in vitro* conservation offers subsidies to keep genetic resources safe both in the long or short term, keeping them free of pathogens and environmental adversities. The species conservation advocates that the greatest genetic variability is preserved, and the use of seeds is advisable. Given the scarcity of basic studies on the *in vitro* germination of *P. flammea*, the objective of this study was to establish a protocol suitable for its germination *in vitro*. Fruiting of individuals native of fragments of Mata Atlântica were collected and stored until its drying, and submitted to form a *bulk*. The seeds were sterilized and inoculated into four different culture media: water + agar, water + MS vitamins (MURASHIGE; SKOOG, 1962), total MS and ½ MS, combined with 5 concentrations of GA₃: (0µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM and 100 µM). The experiment was evaluated for 30 days and the parameters were measured: Germination percentage (P%) and Germination Speed Index (GSI). The interaction between culture media and concentrations of GA₃ used were statistically identical to the parameters evaluated. The germination started on an average of 9 days after inoculation, and the average P% P was 95%, regardless of the constitution of the culture medium. The high and fast germination may be a consequence of the terrestrial habit of *P. flammea*, and of its efficiency in obtaining nutrients from poor environments. The water-agar medium without GA₃ is the most suitable for germination of the species.

3.3 Introdução

A conservação de populações de espécies nativas depende de uma política adequada de proteção ambiental, resgate e conservação dos recursos genéticos (RIBEIRO; SILVA 1996). Embora a conservação *in situ* seja uma das formas mais adequadas para a preservação gênica, algumas desvantagens muitas vezes são empecilhos para sua aplicação, como o fato de necessitar de grandes áreas protegidas de qualquer distúrbio e catástrofe natural, o que pode demandar muitos recursos financeiros. Assim, a preservação da diversidade genética seria mais segura se estivesse baseada na combinação de alternativas de conservação *in situ* e *ex situ*, nesta última, inclui-se a conservação *in vitro*.

A conservação *in vitro* oferece subsídios para manter a salvo recursos genéticos durante longo prazo e em pequeno espaço, mantendo-os livres de patógenos e adversidades ambientais. Dentre as ferramentas biotecnológicas, a Cultivo de Tecidos se destaca nos trabalhos de conservação *in vitro*. Segundo Roca et al. (1991) e Engelmann (1991), para espécies propagadas vegetativamente, como bromeliáceas, a manutenção de coleções de germoplasma *in vitro* é um método promissor e de elevado interesse à conservação de seus recursos genéticos.

Como as bromélias podem ser propagadas de forma sexuada ou assexuada, o cultivo *in vitro* dessas espécies pode ser realizado a partir de sementes, segmentos nodais, meristemas apicais e radiculares, e folhas (MATHEWS; RAO, 1982; CARNEIRO et al., 1999; PICKENS et al., 2003; CARNEIRO; MANSUR, 2004). Entretanto, para fins de conservação e preservação de espécies é desejável que a maior variabilidade genética esteja presente na porção preservada. Sendo assim, o processo sexual, que envolve a formação de sementes e das quais podem ser obtidas grandes quantidades de plântulas (RAUH, 1979), garante a diversidade genética da espécie ao utilizar sementes oriundas de diferentes populações (MERCIER; NIEVOLA, 2003).

O cultivo *in vitro* de bromélias tem sido muito utilizado para fins comerciais e tem ganhado espaço na preservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção (CARNEIRO; MANSUR, 2004; RECH FILHO et al., 2005). Essa ferramenta oferece vantagens para a conservação de recursos genéticos a curto e médio prazo, destacando-se o estabelecimento de coleções em espaços reduzidos, menores custos

de manutenção, a obtenção de material de boa qualidade fitossanitária, proteção contra a variação de fatores climáticos e acidentes ambientais e proporciona alta taxa de multiplicação de material vegetal (ENGELMANN, 1991; ZORNIG, 1996; WITHERS; WILLIAMS, 1998; VALOIS et al.,2001). Em condições favoráveis, o cultivo *in vitro* ainda proporciona certo nível de sincronismo de germinação (BEGON et al.,1990; FERREIRA et al.,2001), além de ser de grande importância na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas de extinção, visto que a porcentagem de sementes germinadas e a velocidade de germinação são superiores quando comparadas ao processo ocorrido em ambiente natural (MERCIER; KERBAUY, 1995).

O cultivo *in vitro* a partir de sementes é aconselhado também por gerar um grande número de plantas-matrizes, evitando a retirada de indivíduos da natureza, o que agravaria o grau de ameaça sobre essas espécies, assim como proporciona maior eficiência na desinfestação de sementes quando comparadas aos demais explantes (MERCIER; KERBAUY, 1994).

Adicionalmente, as plântulas obtidas *in vitro* podem funcionar como doadoras de explantes para posterior processo de propagação, visando à clonagem em larga escala, auxiliando na redução da atividade extrativista e no abastecimento do mercado paisagístico e floricultor. Essas plântulas também podem ser mantidas em meio de crescimento sendo posteriormente aclimatizadas.

A germinação de bromélias *in vitro* tem sido relatada na literatura com resultados diferenciados para as espécies. Segundo Pompelli et al. (2006), o conhecimento disponível para o manejo e análise de sementes de plantas nativas é restrito, não sendo conhecidos atributos físicos e fisiológicos, bem como informações básicas sobre a germinação, o cultivo e as potencialidades dessas espécies.

Estudos abrangendo a germinação de espécies de Bromeliaceae têm obtido altas taxas de germinabilidade, utilizando a forma gelificada dos meios de Knudson (1946) ou Murashige e Skoog (1962), com sacarose e sem reguladores de crescimento. No entanto, a concentração salina desses meios pode influenciar o desenvolvimento inicial de algumas espécies de bromélias (MERCIER; KERBAUY, 1994; MERCIER; NIEVOLA, 2003).

As respostas *in vitro* são genótipo-específicas, por isso torna-se interessante conhecer o hábito natural das espécies a fim de adequá-las ao cultivo *in vitro*. A ordem

Pitcairnioideae é composta, principalmente de plantas terrestres, com um sistema radicular extenso para absorção de água e nutrientes (BSI, 2005). Destacam-se por serem muito eficientes em termos de ciclagem de nutriente, podendo tolerar locais pobres, absorvendo nutriente eficazmente (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Cada genótipo também apresenta exigências próprias para germinação, havendo frequentemente grandes esforços na pesquisa dos fatores mais adequados para que o processo ocorra. É conhecido que a água, a luz e a temperatura, bem como os fitorreguladores podem interferir nos processos metabólicos que desencadeiam a germinação de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Dentre os reguladores vegetais, as giberelinas (GA_3) controlam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (YAMAGUSHI; KAMIYA, 2001). Promovem a germinação de sementes, atuam na ativação do crescimento vegetativo do embrião, na mobilização das reservas do endosperma e no enfraquecimento da camada de endosperma que circunda o embrião, favorecendo assim o seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Bellintani et al. (2007) estudaram a germinação *in vitro* das bromélias *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição e *Neoregelia mucugensis* Leme, concluindo que *O. mucugense* deve ser semeada em água-ágar, enquanto *N. mucugensis* pode ser semeada tanto em água-ágar quanto em MS com metade da concentração de sais ($MS \frac{1}{2}$).

Moreira et al. (2008) estudaram a germinação *in vitro* de bromélias com alto interesse econômico no mercado paisagístico e/ou eminente risco de extinção e concluíram que *Aechmea fasciata*, *Aechmea miniata*, *Vriesea* sp. e *Aechmea* sp. germinam em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem adição de GA_3 . Para *Vriesea* sp., os melhores resultados foram obtidos em meio de cultivo suplementado com GA_3 , como também relatado por Aranda-Peres e Rodrigues (2006). Isso reforça a necessidade de serem obtidos protocolos específicos para as diferentes espécies que se deseja conservar.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo adequado para germinação *in vitro* de *P. flammea*, visando obter plantas matrizes para estudos de micropropagação, como ferramenta a ser utilizada em programas de preservação da espécie e introdução da mesma no mercado paisagístico e floricultor de modo sustentável.

3.4 Material e métodos

Frutos de *P. flammea* foram coletados de 20 indivíduos nativos pertencentes aos três locais de coleta objetos deste estudo. Os frutos foram armazenados em sacos de papel e secos em estufa a 50 °C durante 48 horas, sendo então armazenados em geladeira.

Para montagem do experimento, foi criado um *bulk* de sementes, em que um ou dois frutos de cada indivíduo tiveram suas sementes extraídas manualmente e misturadas às sementes dos demais indivíduos.

Primeiramente, foi realizada uma desinfestação por imersão das sementes em álcool 70% durante 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito comercial 2-2,5% por 5 minutos e enxágue em água destilada estéril. Uma segunda desinfestação em capela de fluxo laminar procedeu-se com a imersão das sementes em álcool 70% por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% por 5 minutos e três enxágues em água destilada autoclavada.

A composição dos meios de cultivo utilizados está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Meios de cultivo utilizados para a germinação *in vitro* de *P. flammea*

Meio de cultivo	Composição do meio
Água-ágar	Água destilada
Água+vitaminas	Vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)
MS	Sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)
MS ½	Metade da concentração dos sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

Todos os meios de cultivo, com exceção do meio água-ágar, foram acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose. Os meios foram solidificados com 7 g.L⁻¹ de ágar e tiveram seu pH ajustado a 5,8, sendo autoclavados a 121 °C durante 20 minutos.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4x5, sendo 4 meios de cultivo e 5 concentrações do regulador GA₃ (0 µM; 25 µM; 50 µM; 75 µM e 100 µM) com 3 repetições, sendo a unidade experimental constituída de uma placa de Petri, contendo 25 sementes, totalizando 75 sementes por tratamento.

O experimento foi mantido em sala de cultivo em temperatura aproximada de 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 16 h.

Os parâmetros avaliados foram a Porcentagem de Germinação (P%) e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

A avaliação constou de contagem visual de sementes germinadas a cada dia, durante 30 dias. A semente foi considerada germinada quando houve a emissão da primeira raiz.

Para fins de cálculo do IVG foi utilizada a fórmula sugerida por Maguire (1962):

$$IVG = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n, \text{ onde:}$$

E_i = número de sementes emergidas;

N_i = número de dias da semeadura até a emergência da primeira raiz.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o Programa Sisvar (2000).

3.5 Resultados e discussão

Tanto a P% quanto o IVG não foram influenciados pela presença ou ausência de nutrientes e de GA₃ nos meios de cultivo (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 – Análise de variância para P% de sementes de *P. flammea*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio	3	611,2000	203.733333	2.481	0.0749 ^{ns}
GA₃	4	99,7333	24.933333	0.304	0.8739 ^{ns}
MeioxGA₃	12	1114,1333	92.844444	1.130	0.3642 ^{ns}
Erro	40	3285,3333	82.133333		
Total corrigido	59	5110,4000			
CV(%)	9,48				
Média geral	95,60	Número de observações 60			

^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 3 – Análise de variância para IVG de sementes de *P. flammea*

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Meio	3	57.178007	19.059336	1.284	0.2930 ^{ns}
GA₃	4	99.318527	24.829632	1.673	0.1753 ^{ns}
MeioxGA₃	12	332.978127	27.748177	1.869	0.0691 ^{ns}
Erro	40	593.706200	14.842655		
Total corrigido	59	1083.180860			
CV(%)	41,48				
Média geral	9,2870	Número de observações 60			

^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a propagação *in vitro* de *P. flammea* por sementes é viável, atingindo altos índices de germinação, em média 95% e iniciando a germinação, em média, aos 9 dias após a inoculação (Tabela 4), independente do tratamento utilizado (Figura 1).

Tabela 4 – Médias das taxas de P% e IVG para as sementes de *P. flammea* em função dos tratamentos utilizados

Meio de cultivo	Concentração de GA₃	P%	IVG
Água	0	100	11,96
	25	100	7,57
	50	98,66	13,88
	75	90,66	8,60
	100	82,66	8,83
Água+vitaminas	0	88	12,74
	25	86,66	14,23
	50	94,66	7,50
	75	85,33	7,09
	100	100	9,19
MS 1/2	0	100	6,17
	25	97,33	6,33
	50	96	6,42
	75	100	5,75
	100	97,33	14,31
MS	0	98,66	12,04
	25	98,66	5,78
	50	100	9,49
	75	100	7,82
	100	97,33	9,96
Média		95,6	9,29

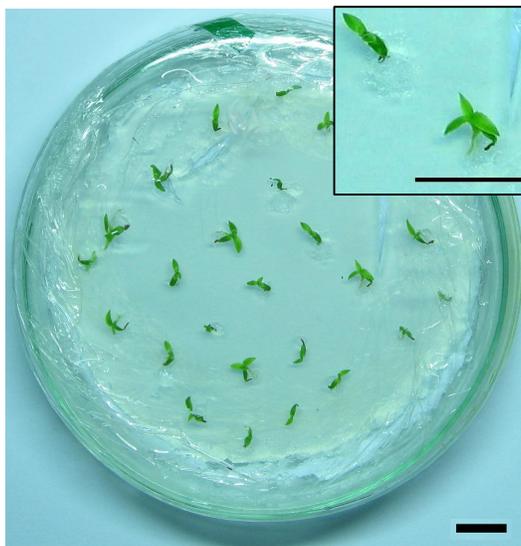


Figura 1 – Plântulas obtidas de sementes de *P. flammea* germinadas *in vitro*: meio MS com 75 μ M de GA₃. Barra = 1 cm.

Provavelmente, a alta P% e o baixo IVG, mesmo em meio água-ágar, devem-se ao hábito terrestre de *P. flammea* e sua eficiência em obter nutrientes de ambientes pobres (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Pompelli (2006), estudando outro membro da subfamília Pitcairnioideae, *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides*, ao comparar a germinação em meio MS com e sem GA₃, comprovou que a ausência ou presença do regulador proporcionaram resultados estatisticamente iguais para P% (75,8%).

Altas taxas de P% foram obtidas em outras espécies de bromélia: 74,3% para *Neoregelia cruenta* em meio MS (CARNEIRO et al, 1999), 86,7% em *Tillandsia eizii* (PICKENS et al, 2003), 90% para *Aechmea nudicaulis* e para *Streptocalyx floribundus* (PINHEIRO; BORGUETI, 2003). Somente Bellintani et al. (2007) utilizaram meio água-ágar em seus estudos e o compararam ao meio MS ½, obtendo em média 94% de germinabilidade para *Neoregelia mucugensis* (Subfamília: Bromelioideae) sendo ambos estatisticamente iguais. Para *Orthophytum mucugense* (Subfamília: Bromelioideae), a maior porcentagem de germinação (58,5%) foi em água-ágar, sendo 14% em MS ½. O meio de cultivo utilizado não influenciou o IVG para nenhuma das espécies, obtendo-se plântulas de *N. mucugensis* e de *O. mucugense* na segunda e na quarta semana após a inoculação, respectivamente.

Moreira et al. (2008) não obtiveram germinação das espécies *Aechmea burle-marxii* e *Bromelia antiacantha* em meio MS, mas *Aechmea* sp. apresentou resultados estatisticamente iguais, sendo 74 e 76% de germinação com 1 e 10 μM de GA_3 , respectivamente. Para as espécies *A. fasciata* e *A. miniata* não houve diferença significativa entre as concentrações de GA_3 , sendo o IVG igual a 1,0 e 5,76, respectivamente e a P% de 100% de germinação para ambas as espécies.

Droste et al. (2005) obtiveram altas taxas de germinação com *Vriesea gigantea* e *V. philippocoburgii*, 99 e 89%, respectivamente, em meio MS e na ausência deste regulador vegetal.

Aranda-Peres e Rodriguez (2006) verificaram que sementes de *Aechmea bromelifolia* e *A. distichantha* germinaram relativamente bem em meio sem reguladores de crescimento quando comparadas a espécies de Tillandsioideae que apresentaram baixa taxa de germinação. Entretanto, *Racinaea* sp. (Tillandsioideae) apresentou P% igual a 62% em meio MS $\frac{1}{4}$ e o uso de GA_3 não foi significativo.

3.6 Conclusão

Os tratamentos utilizados para germinação *in vitro* de *P. flammea* foram estatisticamente iguais. Assim, o meio água-ágar sem GA_3 poderia ser o mais indicado para germinação da espécie.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem afirmar que a germinação *in vitro* dessa espécie é viável, sendo possível o estabelecimento de plantas-matrizes para futuros ensaios de micropropagação que possam subsidiar programas de conservação de *P. flammae* e a comercialização sustentável.

3.7 Referências Bibliográficas

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ A. P. M.. Bromeliad. In: ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. IV Piracicaba: Global Science Books, Cap. 73, p. 644-655. 2006.

BEGON, M. J.; HARPER, L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: individuals, populations, and communities**. Massachusetts (USA): Rand McNally, p. 945, 1990.

BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C., BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F. DE; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1101-1103, 2007.

BSI - Bromeliad Society International). **Bromeliad taxonomy**. 2005. Disponível em <<http://www.bsi.org>>. Acesso em: 15 de jun de 2009.

CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 79-83, 1999.

CARNEIRO, L. A.; MANSUR, E. Contribuição de metodologias *in vitro* para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, v. 2, p. 12-20, 2004.

DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. *In vitro* Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.

FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; ROSA, S. G. T.; SILVEIRA, T. S.; STIVAL, A. L.; SILVA, A. A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 2, p. 231- 242, 2001.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MATHEWS, V. H.; RAO, P. S. *In vitro* plant regeneration in lateral bud explants of *Cryptanthus bromelioides* var. Tricolor M. B. Foster. **Plant Cell Rep.**, v. 1, p. 108-110, 1982.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Bromeliad**, v. 44, p. 120-124, 1994.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana*, v. 16, p. 147-149, 1995.

MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, v. 1, p. 57-62, 2003.

MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. de C.; SOUZA, F. V. D.; BASTOS, L. P.; ROCHA, M. A. C. da. Germinação de sementes *in vitro* de espécies de bromélias ameaçadas de extinção. **Magistra**, v. 20, p. 321-327, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PICKENS, K. A.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y.; WOLF, J. H. D. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii in vitro*. **HortScience** v.38, p.101-104, 2003.

PINHEIRO, F.; BORGHETTI, F. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesebach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Shultes f.) Mez (Bromeliaceae). **Acta Bot. Bras.**, v. 17, n. 1, 2003.

POMPELLI, M. F. Germinação de *Dyckia encholirioides var encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Floresta e Ambiente**. v.13, p. 01 – 09, 2006.

RAUH, W. **Bromeliads for home, gardens and greenhouses**. London: Blandford, 1979.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MÜLLER, C. V. ; GUERRA, M. P. 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1799 – 1808, 2005.

RIBEIRO, J. F.; SILVA, J. C. S. Manutenção e recuperação da biodiversidade do bioma cerrado: o uso de plantas nativas. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS 1., 1996, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa-CPAC, 1996. p. 10-14.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVES, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p. 697-714. 1991.

SISVAR, **Sistema para análise de variância para Windows versão 4.3**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. DE. Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rodanópolis: Fundação MT, p. 124-147, 2001.

WITHERS, L.A; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES, A . C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A . (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília : EMBRAPA, 1998. v. 1.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T. Distinc cell specific expression patterns of early and late gibberellins biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. **Plant Journal**, Oxford, v. 28 p. 443-453, 2001.

ZORNIG, R. K. Micropropagação de bromélias. **Bromélia**, v. 3, p. 3-8, 1996.

4 CAPÍTULO 3 – MENSURAMENTO DO CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR DE *Pitcairnia flammea* Lindley (Bromeliaceae) VIA CITOMETRIA DE FLUXO

4.1 Resumo

NOGUEIRA, Ester Ujiie, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, março de 2010. **Mensuramento do conteúdo de DNA nuclear de *Pitcairnia flammea* Lindley (Bromeliaceae) via citometria de fluxo.** Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima.

A quantidade de DNA nuclear, que expressa o tamanho do genoma de um organismo, pode ser mensurada em picogramas (pg) e tem significado biológico fundamental em várias áreas. A quantificação do conteúdo de DNA é uma etapa importante na caracterização genômica de qualquer espécie. Os genomas das espécies da família Bromeliaceae têm sido medidos, em picogramas, por citometria de fluxo (CF). Embora as bromélias sejam estudadas sob diversos aspectos botânicos, ecológicos e evolutivos, os estudos de CF ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi mensurar o conteúdo 2C de DNA nuclear de *P. flammea* via CF e verificar a estabilidade do tamanho do genoma dessa espécie após seu cultivo *in vitro*. Foram utilizadas folhas jovens de plantas germinadas *in vitro* e de um espécime nativo mantido em casa de vegetação para análise em CF. O tampão OTTO foi usado para a extração dos núcleos de *P. flammea* e o conteúdo de DNA nuclear foi comparado ao padrão *Raphanus sativus*. Os coeficientes de variação mantiveram-se entre 2,04 e 4,80%. O conteúdo 2C de DNA nuclear de *P. flammea* Lindley foi mensurado em 1,45 pg e foi constatada a estabilidade do tamanho do genoma dessa espécie após seu cultivo *in vitro*.

4.2 Abstract

NOGUEIRA, Ester Ujiie, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, In march 2010. **Measurement of nuclear DNA content of *Pitcairnia flammea* Lindley (Bromeliaceae) by flow cytometry.** Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima.

The amount of nuclear DNA, which expresses the size of the genome of an organism, can be measured in picograms (pg) and is biologically important in several areas. Quantification of DNA content is an important step in genomic characterization of any species. The genomes of species of Bromeliaceae have been measured in picograms, by flow cytometry (FC). Although bromeliads are studied under various botanical, ecological and evolutionary aspects, studies of CF are still scarce. The aim of this study was to measure the 2C nuclear DNA content of *P. flammea* via CF, and verify the stability of the genome size of this species after its cultivation *in vitro*. Young leaves of plants grown *in vitro*, and a native specimen kept in a greenhouse for analysis in CF were used. OTTO buffer was used for the extraction of the nuclei of *P. flammea*, and nuclear DNA content was compared to standard *Raphanus sativus*. The coefficients of variation remained between 2.04 and 4.80%. The 2C nuclear DNA content of *P. flammea* Lindley was measured at 1.45 pg, and it was found the stability of the genome size of this species after its cultivation *in vitro*.

4.3 Introdução

A quantidade de DNA nuclear de um organismo, referida como valor C, expressa o tamanho do genoma haploide não replicado. O conteúdo de DNA é mensurado em picogramas (pg), 10^{-12} g, que pode ser convertido em pares de bases, sendo que 1 pg corresponde a $0,978 \times 10^9$ pb (DOLEŽEL; BARTOŠ, 2005).

O valor C de DNA tem significado biológico fundamental por ser útil em vários campos (BENNET; LEITCH, 1995). Esse dado auxilia pesquisas na área de biologia molecular, revelando a complexidade dos genomas a serem estudados, já que até o momento o tamanho do genoma nuclear continua desconhecido para aproximadamente 99% das angiospermas (BENNET; LEITCH, 2003).

A quantificação do conteúdo de DNA é um passo importante na caracterização genômica de qualquer espécie, com aplicabilidade em estudos evolutivos, ecológicos, de biodiversidade (KNIGHT; BEAULIEU, 2008; BENNET; LEITCH, 2005), biologia celular, ecologia, sistemática e taxonomia (DOLEŽEL et al, 2007; KOLÁR et al, 2009). No que diz respeito às espécies da família Bromeliaceae, os genomas nucleares têm sido medidos, em picogramas (pg), por citometria de fluxo (CF).

A CF é uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão de luz e fluorescência) de partículas coradas que fluem numa suspensão líquida. Essa é a principal diferença entre a CF e outras técnicas de análise quantitativa de núcleos isolados ou cromossomos, como a citometria de imagem, que necessita da fixação das partículas em uma lâmina (DOLEŽEL, 1997a).

A suspensão líquida é introduzida no citômetro de fluxo e move-se partícula a partícula, em fluido laminar, no centro do fluxo (DOLEŽEL 1997a). Essas partículas intersectam um feixe de luz, com origem em uma ou mais fontes de iluminação (laser e/ou lâmpada de mercúrio). Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotônica e/ou de emissão de fluorescência. Os fótons que são dispersos frontalmente vão ser recebidos e analisados por um fotodiodo (detector da dispersão frontal) e os que são dispersos ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e são analisados em tubos fotomultiplicadores (dispersão lateral e fluorescência). Os tubos fotomultiplicadores convertem e amplificam os sinais luminosos recebidos em pulsos eletrônicos que por sua vez são convertidos em

pulsos analógico-digitais processados por analisadores em vários canais. Os sinais de cada partícula vão-se acumulando em tempo real na forma de histogramas que são visualizados no monitor de um computador (CÔRTE-REAL *et al.*, 2002).

Uma vez que a CF analisa as partículas individualmente a uma velocidade elevada, populações numerosas de células, organelas ou cromossomos podem ser medidas em um espaço de tempo relativamente curto, e sub-populações desses citomas podem ser facilmente detectadas (DOLEŽEL 1997b). Além disso, a citometria apresenta as vantagens de não necessitar de células em divisão e ser uma metodologia não destrutiva, pois necessita de apenas uma amostra, por exemplo, 50 mg de folha.

Entretanto, variações dos resultados da CF podem ocorrer e geralmente estão relacionadas com as metodologias de isolamento dos núcleos, com a coloração do DNA e com a leitura no citômetro de fluxo (MARIE; BROWN 1993).

Diferentes pesquisadores vêm desenvolvendo metodologias para isolamento de núcleos intactos de células vegetais e o método clássico desenvolvido por Galbraith *et al.* (1983) tem sido o mais utilizado.

A composição dos tampões utilizados é determinada pela necessidade de inibir a atividade das nucleases, de preservar a integridade dos núcleos e de fornecer as melhores condições para a coloração do DNA. Os tampões mais utilizados apresentam geralmente, cátions Mg^{2+} (GALBRAITH *et al.*, 1983, ARUMUGANATHAN; EARLE 1991) ou poliaminas (DE LAAT *et al.*, 1987, DOLEŽEL *et al.*, 1989) para estabilizar a cromatina. Detergentes não iônicos como Tween e Triton 100-X também são adicionados aos tampões, além de serem acrescidos de antioxidantes, como mercaptoetanol e poli-vinil pirrolidona (PVP), que têm como função inibir a ação de compostos fenólicos (ENDEMANN *et al.*, 2002, GALBRAITH *et al.*, 2002).

Após o isolamento dos núcleos, segue-se uma etapa de filtração para eliminar os resíduos provenientes de restos de parede celular e tecido vegetal. A etapa de coloração é realizada e um fluorocromo se liga especificamente ao DNA. Os fluorocromos mais utilizados na estimativa do conteúdo de DNA nuclear são o iodeto de propídio (IP), o brometo de etídio (BE) e o 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). O IP e o BE intercalam-se na cadeia dupla do DNA (LEPECQ; PAOLETTI, 1967). Os primeiros estudos foram efetuados utilizando BE, mas Crissman *et al.* (1976)

mostraram que o IP produz histogramas de fluorescência com coeficientes de variação (CV) ligeiramente menores aos obtidos com BE. Como ambos os corantes também se ligam à cadeia dupla de RNA, a precisão das determinações do conteúdo de DNA é dependente da destruição do RNA por RNases adicionadas ao tampão (PRICE; JOHNSTON 1996). O corante DAPI se liga a pares de base específicos e fornece geralmente resultados com CVs mais baixos ($CV < 2$) que os corantes intercalantes. Todavia, os corantes base específicos não fornecem estimativas corretas do conteúdo de DNA nuclear, quando se utilizam padrões de referência cuja composição em bases não seja idêntica à composição da amostra em estudo. Doležel (1991) descreve esse problema e sugere que os corantes intercalantes sejam preferencialmente usados para efetuar estimativas exatas do conteúdo de DNA nuclear.

A estimativa do tamanho do genoma nuclear por CF em unidades absolutas (pg de DNA ou Mpb) pode ser conseguida pela medição simultânea da amostra e do padrão de referência. O tamanho do genoma da amostra é calculado pela razão das posições dos picos dos núcleos em G_0/G_1 da amostra/padrão multiplicado pelo conteúdo em DNA da planta de referência.

Apesar das bromélias serem estudadas sob diversos aspectos botânicos, ecológicos e evolutivos, os estudos de CF são escassos. As primeiras espécies de Bromeliaceae que tiveram seu DNA nuclear quantificado foram *Ananas bracteatus* (Lindl.) Schult. F. e *A. comosus* L. Merrill (abacaxi cultivado), para as quais Bennet e Leitch (1995) reportaram $1C = 0,45$ e $0,55$ pg, respectivamente. Posteriormente, Ramírez-Morillo e Brown (2001) estimaram o conteúdo de DNA nuclear $2C$ para espécies do gênero *Crypanthus* e relataram que os valores variaram de $0,64$ a $1,45$ pg. Por sua vez, Sgobarti et al. (2004), estudando *Puya raimondii*, afirmaram que o conteúdo de DNA dessa espécie foi estimado em $2C=1,13$ pg.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para mensurar o conteúdo $2C$ de DNA nuclear de *P. flammaea* Lindley via CF e verificar se o tamanho do genoma dessa espécie permanece estável, após seu cultivo *in vitro*.

4.4 Material e métodos

4.4.1 Material biológico

Sementes e um espécime de *P. flammea* foram coletados em fragmentos de Mata Atlântica no Sul do Estado do Espírito Santo. O espécime-testemunho de *P. flammea* foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o número CESJ 55670. As sementes foram germinadas e cultivadas *in vitro* e o espécime foi mantido em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Sementes de *Raphanus sativus* L 'Saxa' (2C = 1,11 pg, DOLEŽEL et al., 1992) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jaroslav Doležel do Instituto Experimental de Botânica da República Tcheca. As análises citométricas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

4.4.2 Citometria de fluxo

Folhas jovens e vigorosas de *P. flammea* (amostra), mantidas *in vitro* e em casa de vegetação, e de *R. sativus* L. (padrão) foram coletadas para mensuramento do conteúdo 2C de DNA nuclear.

As folhas da amostra e do padrão foram mantidas em água destilada a 4°C e cortadas separadamente ou simultaneamente em fragmentos de 2 cm². O material foi retalhado (GALBRAITH et al., 1983) com lâmina de barbear em placa de Petri, contendo 0,5 mL do tampão de extração nuclear, Otto I a 4 °C, composto por 0,1 M de ácido cítrico e 0,5% de Tween 20 (Sigma-Aldrich CHIMIE, GmbH Steinheim, Germany) (OTTO, 1990). Esse tampão de extração nuclear foi suplementado com 2,0 mM de ditioneitol (Sigma-Aldrich CHIMIE, GmbH Steinheim, Germany) e 50 µM mL⁻¹ de RNase (Sigma-Aldrich CHIMIE, GmbH), pH 2.3 (LOUREIRO et al., 2006; CLARINDO; CARVALHO 2009; ROSADO et al., 2009) e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada em telas de 30 µm (Partec GmbH, Munster, Germany), em microtubos de 2,0 mL (Eppendorf, Hamburg, Germany), adicionando-se 0,5 mL de Otto I na placa de Petri, para lavagem e filtragem. Após a centrifugação (microCentrifugette®, ALC International 4214 – Italy) por 5 minutos a

1463 g o sobrenadante foi removido. O precipitado foi ressuspensionado com a adição de 100 µL de Otto I e incubado por 5 a 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de tampão Otto II composto por 0,4 M de Na₂ HPO₄.12H₂O (Merck®), 2 mM de ditioneitol®, 50 µL mL⁻¹ de RNase (Sigma-Aldrich CHIMIE, Gmbh) e 75 µM de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich CHIMIE, Gmbh) (OTTO, 1990), pH 8.6.

A suspensão nuclear foi passada em filtro de nylon de 20 µm (Partec Gmbh, Munster, Germany) e mantida no escuro por 30 minutos (ABREU et al., 2008; CLARINDO; CARVALHO, 2010; ROSADO et al., 2009). A suspensão foi analisada em citômetro de fluxo Partec PAS (Partec® Gmbh, Munster, Alemanha), equipado com uma fonte de laser (488 nm) e filtro RG 610 que permite a passagem de luz no comprimento de onda do vermelho. O equipamento foi calibrado e alinhado conforme recomendações da Partec Gmbh. Os histogramas gerados foram analisados no programa FlowMax (Partec® Gmbh, Munster, Alemanha).

O tamanho do genoma nuclear de *P. flammea* foi mensurado, comparando-se os picos correspondentes aos estágios de G₀/G₁ relativos ao DNA nuclear do padrão *R. sativus* e das amostras, conforme a fórmula abaixo:

$$2C_{\text{da amostra}} \text{ (pg)} = \frac{2C_{\text{do padrão}} \times \text{Canal}_{\text{da amostra}}}{\text{Canal}_{\text{do padrão}}}$$

Em que:

$2C_{\text{da amostra}}$ = Conteúdo de DNA nuclear da amostra (pg)

$2C_{\text{do padrão}}$ = Conteúdo de DNA nuclear do padrão (pg)

$\text{Canal}_{\text{da amostra}}$ = Canal dos núcleos em G₀/G₁ da amostra

$\text{Canal}_{\text{do padrão}}$ = Canal dos núcleos em G₀/G₁ do padrão

O pico correspondente aos núcleos G₀/G₁ do padrão foi ajustado para o canal 200. Seis repetições, com aproximadamente 10.000 núcleos analisados, foram realizadas independentemente e o genoma foi mensurado em picogramas (pg).

4.5 Resultados e Discussão

Uma vez que a literatura relata que as bromélias possuem conteúdo de DNA nuclear variando de 0,45 a 1,45 pg (BENNET; LEITCH, 1995; RAMÍREZ-MORILLO E BROWN, 2001), *Raphanus sativus* L. (2C = 1,11 pg DOLEŽEL et al., 1992) foi o padrão escolhido neste estudo, evitando problemas de linearidade nos histogramas.

A seleção de um padrão apropriado para análises citométricas é importante para a estimativa do tamanho do genoma nuclear (DOLEŽEL et al., 2007). Alguns autores têm documentado o uso de núcleos de células animais como padrão de referência para espécies de plantas (GRATTAPAGLIA; BRADSHAW, 1994; AZMI et al., 1997). No entanto, Johnston et al. (1999) afirmaram que a quantificação do DNA de genomas animais tem apresentado variação entre diferentes amostras, além de apresentarem problemas devido à inconstância dos picos de fluorescência durante diferentes preparações com a mesma amostra e por apresentar valor 2C de DNA diferente da literatura mais citada (GALBRAITH et al., 1983). Além disso, esses padrões animais constituem padrões pseudo-externos, já que não podem ser preparados juntamente com a amostra. Devido a todos esses problemas, sugere-se que em análises de CF de genomas vegetais sejam usados padrões vegetais, já que existem padrões com valor 2C de DNA internacionalmente utilizados (DOLEŽEL et al., 1992; DOLEŽEL et al., 1998).

Em estudos de bromélias, diferentes padrões têm sido utilizados. Ramírez-Morillo e Brown (2001) utilizaram *Glicine max* (2C = 2.78 pg) como padrão de referência para *Crypanthus beuckeri*, enquanto Sgobarti et al. (2004) utilizaram eritrócitos de galinha (CRBC) ao estudar *Puya raimondii*. No entanto, devido às divergências nos valores estimados e as diferenças estruturais entre as células animais e vegetais, CRBC constituem um padrão de qualidade inferior (JOHNSTON et al., 1999).

A utilização do padrão externo possibilitou conhecer o canal referente ao pico dos núcleos em G_0/G_1 e o da amostra quando usado internamente. Além disso, também permitiu determinar os parâmetros de análise do citômetro, como o ganho, que definiu os canais de localização dos picos dos núcleos em G_0/G_1 .

No presente estudo, os picos dos núcleos em G_0/G_1 apresentaram CVs entre 2,04 e 4,80%, sendo; portanto, adequados, pois Doležel e Bartoš (2005) relataram que CVs

abaixo de 5% são aceitáveis para as avaliações de análises de CF. Em outros estudos com bromélias, não foram reportados CVs. A metodologia utilizada para *P. flammea* tem fornecido picos com CVs baixos em diversas espécies como *Eucaliptus* (CVs entre 1,10 e 3,8%) e *Coffea* (CVs entre 2,75 a 4,80%) (PRAÇA et al., 2009; CLARINDO; CARVALHO, 2009).

Os tampões Otto, segundo Doležel e Bartoš (2005) geram histogramas exibindo picos dos núcleos em G_0/G_1 com resolução inigualável para a maioria das espécies vegetais, especialmente das espécies com genoma pequeno (LOUREIRO et al., 2006), como bromélias. O tampão Otto-I contém ácido cítrico, que aumenta a acessibilidade da cromatina ao fluorocromo e torna a estrutura da cromatina da amostra e do padrão uniformes. Assim, evitam-se diferenças na intensidade de coloração, resultando em histogramas com alta resolução e CVs baixos (DOLEŽEL; BARTOŠ 2005; LOUREIRO et al., 2006) como observado em nossas análises. Também foi adicionado ao tampão Otto-I o antioxidante ditiotreitol, que preserva a integridade da cromatina e minimiza erros estequiométricos na coloração do DNA (DOLEŽEL; BARTOŠ 2005). Ramírez-Morillo e Brown (2001) e Sgobarti et al. (2004) ao aplicarem a CF em bromélias utilizaram tampões Tris.MgCl₂ semelhantes ao elaborado por Pfosser et al., (1995) (200mM Tris, 4mM MgCl₂.6H₂O, 0,5% (v/v) Triton X-100, pH 7.5). Loureiro et al. (2006) compararam o tampão Tris.MgCl₂ a outros três tampões, inclusive ao tampão Otto (1992) utilizado neste trabalho, em sete espécies vegetais, e afirmaram que o uso do tampão Tris.MgCl₂, em geral, forneceu resultados inferiores aos demais tampões. Esses autores escolheram *Sedum burrito* para representar espécies com baixo conteúdo de DNA nuclear ($1,30 \pm 0,09$ pg) e folhas com grande quantidade de parênquima aquífero, duas características semelhantes em bromélias. Foi relatado que o tampão Otto forneceu CVs entre 2,55 e 3%, enquanto o tampão Tris.MgCl₂ forneceu CVs entre 4,10 e 5,87%, salientando que este último pode ocasionar CVs não aceitáveis, conforme Doležel e Bartoš (2005).

Outro procedimento que proporciona a obtenção de histogramas com baixo CV é a realização do descarte do sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado nuclear, o que reduz interferências nas análises de CF (OTTO, 1990; CROS et al., 1995), como metabólitos secundários e organelas autofluorescentes, como cloroplastos, por exemplo (CROS et al., 1995).

O genoma de *P. flammea* foi calculado com base nos picos dos núcleos em G₀/G₁ e comparados ao conteúdo médio de DNA nuclear do padrão *R. sativus* (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores do conteúdo de DNA nuclear de *P. flammea*

Repetições	Valores 2C
1	1,43
2	1,42
3	1,46
4	1,48
5	1,45
6	1,47
Média	1,45
Desvio padrão	0,02

O valor médio de conteúdo de DNA nuclear de *P. flammea* foi 1,45 pg ou 1,4181 x 10²¹ pb. Ramírez-Morillo e Brown (2001) reportaram valor de DNA nuclear muito próximo ao de *P. flammea* para a bromélia *Cryptanthus beuckeri* com 2C = 1,458 pg e Sgobarti et al. (2004) encontraram valor de conteúdo de DNA nuclear igual a 1,13 pg para *P. raimondii*. Com os resultados obtidos, é possível afirmar que *P. flammea* possui baixo conteúdo de DNA nuclear em relação ao alto número de cromossomos 2n=50 reportado por Frazão (2006).

Ramírez-Morillo e Brown (2001) utilizaram a CF para investigar se o baixo número cromossômico de *Cryptanthus* (2n = 34 ou 36) poderia ser resultado de um rearranjo, caso o conteúdo de DNA nuclear fosse próximo ao das espécies com 2n = 50 cromossomos, ou se seria resultado de aneuploidia. Esses autores puderam inferir que *Cryptanthus* não possui origem tetraploide e que suas espécies podem ser divididas em dois grupos, um constituído por *C. acaulis* e *C. beuckeri* com valor 2C de DNA nuclear igual a 1,38 e 1,458 pg, respectivamente e 2n = 34 cromossomos. O outro grupo seria formado por *C. bahianus*, *C. schwackeanus* com 2n=34 cromossomos e *O. saxicola* e *B. nutans*, com conteúdo de DNA nuclear mensurado entre 0,64 e 0,75 pg, ambas com 2n=50 cromossomos. Isso sugere que os grupos possuem linhagens diferentes, sendo o primeiro originado por aneuploidias e o segundo por rearranjos cromossomais; entretanto, seria necessário estudar todo o histórico evolutivo da espécie para que tais hipóteses pudessem ser confirmadas.

Para a extração de núcleos de *P. flammea*, utilizou-se folhas frescas, jovens, saudáveis e vigorosas de mesmo padrão e provenientes de ambiente controlado, como recomendado por Bennett et al., (2008). Segundo Pinto et al. (2004), a quantidade, tipo e complexidade dos compostos, como metabólitos secundários, geralmente mudam dependendo da idade do tecido vegetal. Entretanto, Sgorbati et al. (2004), ao estudar *P. raimondii*, utilizaram tecidos previamente fixados, mas essa metodologia apresenta desvantagens, como a tendência para a formação de aglomerados de núcleos, alterações na estrutura da cromatina e diminuição da resolução dos histogramas obtidos.

O conteúdo de DNA das plantas de *P. flammea* cultivadas *in vitro* foi igual ao valor 2C do espécime-testemunha cultivado em casa de vegetação (Figura 1). Portanto, a CF também permitiu verificar que o cultivo *in vitro* não ocasionou variações no conteúdo de DNA nuclear da espécie.

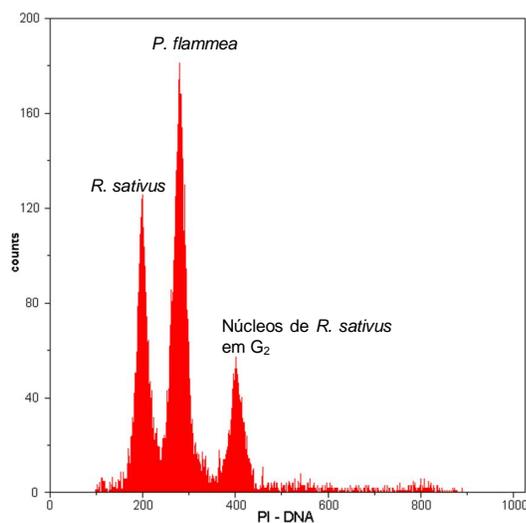


Figura 1- Histograma obtido a partir da análise de núcleos corados com iodeto de propídeo de *P. flammea*: pico da esquerda correspondente aos núcleos G₀/G₁ de *R. sativus* e pico da direita correspondente aos núcleos G₀/G₁ de *P. flammea*.

Entretanto, a ocorrência de alterações no genoma tem sido observada em várias plantas cultivadas *in vitro* (REZENDE et al.,2008; SANTANA et al.,2008) e esse fenômeno é normalmente chamado variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

Segundo Clarindo et al. (2008) e Sangthong et al. (2005), a cultura de tecidos é frequentemente associada à variação somaclonal, muitas vezes responsável por gerar variabilidade genética, o que pode ser interessante quando se deseja obter novas fontes de germoplasma para o melhoramento genético. A poliploidia é uma das ocorrências mais frequentes da variação somaclonal (SANGTHONG et al., 2005). Porém, quando o objetivo do cultivo *in vitro* é a preservação de germoplasma vegetal, o patrimônio genético da espécie em questão deve ser mantido (LIMA et al., 2008).

Clarindo et al. (2008) utilizaram a CF para analisar o nível de ploidia de *Carica papaya* provenientes do cultivo *in vitro*. As análises realizadas mostraram que o nível de ploidia de DNA variou nas mudas clonadas durante os sucessivos subcultivos no meio de multiplicação.

Nakano et al. (2006) utilizaram a CF para avaliar a ploidia de plantas de *Tricyrtis hirta*, planta ornamental usada popularmente no Japão, regeneradas a partir de organogênese indireta. Plantas com um ano de idade foram submetidas à análise de nível de ploidia por CF, após três anos de cultivo. Das 37 plantas analisadas, 28 mantiveram o nível diploide ($2n = 2x = 26$), mas nove foram tetraploides ($2n = 4x = 52$). Os autores verificaram que as plantas tetraploides apresentaram características agronômicas atraentes em comparação com os controles diploides e que nesse caso a variação somaclonal, embora não seja desejada na propagação *in vitro*, ofereceu possibilidades de melhorar o valor agronômico de *T. hirta*.

4.6 Conclusão

O conteúdo 2C de DNA nuclear de *P. flammula* Lindley é 1,45 pg ou $1,4181 \times 10^{21}$ pb.

O tamanho do genoma de *P. flammula* permanece estável após seu cultivo *in vitro*.

4.7 Referências bibliográficas

ABREU, I. S. DE; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1227-1233, 2008.

ARUMUGANATHAN, K. E EARLE, E. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 9, p. 229-233, 1991.

AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRÉ, P.; PROUTEAU, M.; BOUDET, A.M.; CHRQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.9-16, 1997.

BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, v.76, p.113-176, 1995.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms — progress, problems and prospects. **Annals of Botany**, v.95, p. 45-90. 2005

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. 2003. Plant DNA C-value (Release 2.0, Jan. 2003). Disponível em: <<http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>>. Acesso em 12 de jan 2009.

BENNETT, M. D.; PRICE, H. J.; JOHNSTON, S. Anthocyanin inhibits propidium iodide DNA fluorescence in *Euphorbia pulcherrima*: implications for genome size variation and flow cytometry. **Ann. Bot.**, v. 101, p. 777–90, 2008.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 73-81, 2009.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. Flow cytometric analysis using SYBR Green I for genome size estimation in coffee. **Acta Histochemica** (2010) doi:10.1016/j.acthis.2009.10.005.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; ARAÚJO, F. S.; ABREU, I. S.; OTONI, W. C. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 92, p. 207-214, 2008.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M. E LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, v. 71, p. 19-33, 2002.

CRISMAN, H. A.; OKA, M. S. E STEINKAMP, J. A. Rapid staining methods for analysis of Deoxyribonucleic-acid and protein in mammalian-cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 24, p. 64-71, 1976.

CROS, J.; COMBES, M. C.; CHABRILLANGE, N.; DUPERRAY, C.; ANGLES, A. M.; HAMON, S. Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter- and intra-specific variation in African species. **Can J Bot**, v.73, p. 14–20, 1995.

DE LAAT, A. M. M., GÖHDE, W.; VOGELZANG, M. J. D. C. Determination of ploidy level of single plants and plant populations by flow cytometry. **Plant Breeding**, v. 99, p. 303–307, 1987.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 38, p. 285-302, 1997a.

DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p.143-154, 1991.

DOLEŽEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. **Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement**, v. 97, p. 80-90, 1997b.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, p. 99–110, 2005.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P. E LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 31, p. 113-120, 1989.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSÁK, M.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, v. 82, p. 17–26, 1998.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. **Flow cytometry with plants cells**. J. Wiley VCH. 2007. 454p.

DOLEŽEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 625–631, 1992.

ENDEMANN, M.; HRISTOFOROGLU, K.; STAUBER, T. E WILHELM, E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry. **Biologia Plantarum**, v. 44, p. 339-345, 2002.

FRAZÃO, J. G. dos S. **Contribuição de características citogenéticas e moleculares à sistemática de Bromeliaceae**. Recife, (Teses de doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 103p.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GALBRAITH, D.; LAMBERT, G.; MACAS, J. E DOLEŽEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: Current ROBINSON, J., AZMI, A. E.; TUTOIS, S.; WILEY, J. **Protocols in cytometry**, New York. 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, H. D. Nuclear Dna contento f commercially important Eucalyptus species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 24, n. 5, p. 1074-1078, 1994.

JOHNSTON, J. S.; BENNETT, M. D.; RAYBURN, A. L.; GALBRAITH, D. W.; PRICE, H. J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **An. J. Bot.**, v. 86, p. 609-613, 1999.

KNIGHT, C.A.; BEAULIEU, J. Genome size scaling in phenotype space. **Annals of Botany**, v. 101, p. 759–766, 2008.

KOLAR, F.; STECH, M.; TRAVNICEK, P.; RAUCHOVA, J.; URFUS, T.; VIT, P.; KUBESOVA, M.; SUDA, J. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. **Annals of Botany**, v. 103, p. 963-974, 2009.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of genetic variability from cell cultures for improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.

LEPECQ, J. B. E PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids - physical-chemical characterization. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, 87-106, 1967.

LIMA, A. B. P. L.; SOARES, T. C. B.; MATTA, F. DE P.; BARROS, E. G.; NOGUEIRA, E. U.; LOPES, F. S.; SOARES, Y. J. B. Aplicações da biotecnologia no melhoramento de plantas. In: POLANCZYK, R. A.; CECÍLIO, R. A.; MATTA, F. DE P.; SOARES, T. C. B.; PEZZOPANE, J. E. M.; CAMPANHARO, W. A.; OLIVEIRA, M. C. C. de. **Estudos Avançados em Produção Vegetal**, v. 2, 2008.

LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; DOLEŽEL, J.; SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Ann. Bot.**, v. 98, p. 679–689, 2006.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 41-51, 1993

NAKANO, M.; NOMIZU, T.; MIZUNASHI, K.; SUZUKI, M.; MORI, S.; KUWAYAMA, S.; HAYASHI, M.; UMEHARA, H.; OKA, E.; KOBAYASHI, H.; ASANO, M.; SUGAWARA, S.; TAKAGI, H.; SAITO, H.; NAKATA, M.; GODO, T.; HARA, H.; AMANO, J. Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 366-371, 2006.

OTTO, F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: CRISSMAN, H. A.; DARZYNKIEWICZ, Z. (Eds.). **Methods in Cell Biology**. v. 33., p. 105 - 110. Academic Press, New York, 1990.

OTTO, F. Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. In: RADBRUCH A, ed. **Flow cytometry and cell sorting**. Berlin: Springer-Verlag, 101–104, 1992.

PFOSSER, M.; AMON, A.; LELLEY, T.; HEBERLE-BORS, E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. **Cytometry**, v. 21, p. 387–393, 1995.

PINTO, G.; LOUREIRO, J.; LOPES, T.; SANTOS, C. Analysis of genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.580-587, 2004.

PRAÇA, M. M.; CARVALHO, C. R.; NOVAES, C. R. D. B. Nuclear DNA content of three *Eucalyptus* species estimated by flow and image cytometry. **Australian Journal of Botany**, v. 57, p. 524–531, 2009.

PRICE, H. E JOHNSTON, J. 1996. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: JAUHAR, P. (Eds.) **Methods of Genome Analysis in Plants**. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo, p. 115-131.

RAMÍREZ-MORILLO, I. M.; BROWN, G. K. The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). **Systematic Botany**, v. 26, p. 722-726, 2001.

REZENDE, R. K. S.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; CASTRO, E. M. DE. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p. 821-827, 2008.

ROSADO, T. B., CLARINDO, W. R., CARVALHO, C. R. An integrated cytogenetic, flow and image cytometry procedure used to measure the DNA content of Zea mays A and B chromosomes. **Plant Science**, v. 176, p. 154–158, 2009.

SANGTHONG, R., MII, M., SOONTHORNCHAINAKSAENG, P.; SUPAIBULWATANA, K. Characteristics of the tetraploid plant derived as a somaclonal variation in *Lilium longiflorum*. **Acta Hort**,v. 673, p. 167-174, 2005.

SANTANA, J. R. F. DE.; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M. DE.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p. 640-644, 2008.

SGOBARTI, S.; LABRA, M.; GRUGNI, E.; BARCACCIA, G.; GALASSO, G.; BONI, U.; MUCCIARELLI, M.; CITTERIO, S.; BENAVIDES IRAMÁTEGUI, A.; VENERO GONZALES, L.; SCANNERINI, S. A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered Queen of the Andes. **Plant Biology**, v. 6, p. 222-230, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)