

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Caracterização genética, morfológica e fitoquímica de populações de *Bromelia antiacantha* (Bertol.) do Rio Grande do Sul

Camila Martini Zanella

Dissertação de Mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Fernanda Bered

Porto Alegre, março de 2009.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Genética da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, no Departamento de Botânica da UFRGS, Porto Alegre, Brasil e no Laboratório de Análise Genética e Molecular na Universidade de Campinas, São Paulo. O projeto foi subvencionado pelo Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Edital Universal 2008) e pela International Foundation of Science (IFS – 2008). A mestranda obteve bolsa de estudos do CNPQ (24 meses).

Dedico esta dissertação a minha família, que me deu todo o suporte afetivo e emocional, em especial a minha mãe Zamar, as minhas irmãs Mariane e Bruna e aos meus tios Dilnei e Fernanda

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fernanda Bered, obrigada pela orientação, pelo exemplo, estímulo, amizade e confiança durante todo esse período de convivência.

Ao Prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares pela colaboração com análises químicas durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a Anete Pereira de Souza, pelo curso e fomento da biblioteca de microssatélites.

À minha mãe e as minhas irmãs, pelo apoio e confiança dados ao longo dessa jornada.

Aos meus tios, pela compreensão, dedicação e moradia durante esses longos anos de convívio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o mestrado e pelo apoio financeiro para a realização de algumas saídas de campo.

Aos professores do PPGBM pelas aulas e conhecimentos transmitidos.

Às gurias do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas, Gecele Matos Paggi, Manuela Bruxel, Márcia Goetze, Míriam Valli Büttow, Jamilla Sampaio e Adriele Guerra, essa mulherada de fé, agradeço as ajudas a campo, as discussões para desvendar nossos problemas no laboratório, pela convivência e parceria nas mais inusitadas situações.

À Clarisse Palma da Silva pela convivência, ajuda e companheirismo.

Às professoras Maria Helena Bodaneze Zanettini, Márcia Margis, Luciane Passaglia e Eliane Kaltchuk dos Santos, pelo apoio científico, convivência e contribuições para o bom funcionamento do laboratório.

À Silvia pelas dicas e fotos maravilhosas.

Aos amigos e colegas do laboratório de *Genética Molecular Vegetal* do departamento de *Genética* da UFRGS, em especial a Adriana, Anelise, Milena, Ricardo, Rafael A., Rafael O, Samanta, Júlio, João, Rene, Carolina, Andréia, Beatriz pelo companheirismo, apoio, caronas e pelas intermináveis conversas na hora do nosso indispensável café.

Aos meus grandes amigos, Fê, Fofa, Lu, Marina, Hosana, Lívia, Juan, Juliana pelas nossas parcerias eternas e por tornarem esses dois anos muito divertidos com as nossas jantãs, festas e conversas "super intelectuais".

Ao secretário do PPGBM Elmo J. Antunes Cardoso e à Ellen pelo suporte burocrático e apoio para solucionar problemas e tirar dúvidas.

Ao Prof. Dr Maurício Sedrez dos Reis pela colaboração na coleta na FLONA de Três Barras.

À Samantha e ao Diogo pelas coletas em Santa Catarina.

À doutoranda Carolina Schlindwein pela ajuda nos experimentos e análises dos flavonóides e antocianinas.

À Fernanda Cidade e Adna Souza pelo sequenciamento das bibliotecas de SSR

Aos chefes das unidades de conservação, guarda-parque, em especial ao Seu Jairo, e demais pessoas que de alguma forma auxiliaram nas saídas a campo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

A todos, que de alguma forma contribuíram e conviveram comigo, meus sinceros agradecimentos pela contribuição, convivência e carinho.

Muito Obrigada!!!

Sumário

Resumo.....	9
Abstract.....	11
CAPÍTULO 1: Introdução Geral	13
1.1 A família Bromeliaceae.....	14
1.2 <i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni - histórico	15
1.3 <i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni - potencial econômico.....	19
CAPÍTULO 2: Objetivos	20
CAPÍTULO 3: Isolamento e caracterização de <i>loci</i> de microssatélites de <i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni (Bromeliaceae), uma espécie autotetraplóide	22
3.1 Introdução	23
3.2 Materiais e Métodos	25
3.3 Resultados e Discussão	27
CAPÍTULO 4: Diversidade e estrutura genética de populações naturais de <i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni (Bromeliaceae)	31
4.1 Introdução	32
4.2 Materiais e Métodos	36
4.3 Resultados	39
4.4 Discussão.....	40
CAPÍTULO 5: <i>Bromelia antiacantha</i> : morfologia, fitoquímica e etnobotânica de populações da região Sul do Brasil.....	49
5.1 Introdução	50
5.2 Materiais e Métodos	55
5.3 Resultados	59
5.4 Discussão.....	64

CAPÍTULO 6: Considerações finais.....	74
CAPÍTULO 7: Referências Bibliográficas.....	78
ANEXOS.....	95

Resumo

As bromélias são plantas típicas do Novo Mundo e vêm sendo amplamente utilizadas para diversos fins, como ornamentação, fibras, forragem, alimentação, medicinal entre outros. *Bromelia antiacantha* Bertoloni pode ser encontrada em solos úmidos de floresta, restinga e na vegetação secundária, com distribuição do Espírito Santo até o Uruguai. É uma espécie poliplóide, parcialmente auto-incompatível, polinizada por beija-flores e com alta taxa de reprodução clonal. Os frutos são bagas, com propriedades fitoterápicas e utilizados na medicina popular na confecção de xarope para problemas respiratórios. Com o objetivo de estudar a diversidade genética em *B. antiacantha*, marcadores de microssatélites foram desenvolvidos (**Capítulo 3**). Os “primers” foram testados em 51 indivíduos de duas populações e pelo padrão de amplificação dos alelos podemos concluir que *B. antiacantha* é uma espécie autopoliplóide. Padrões de diversidade genética e estruturação populacional foram estudados utilizando cinco *loci* de microssatélites ao longo da planície costeira do Rio Grande do Sul e uma população de Santa Catarina, totalizando 167 indivíduos, amostrados em sete populações (**Capítulo 4**). Os resultados indicaram uma heterozigosidade esperada relativamente alta ($H_E = 0,705$), porém há um déficit de heterozigotos em comparação com os valores de heterozigosidade obtidos ($H_O = 0,337$). A riqueza alélica foi de 1,83 e o número médio de indivíduos com quatro alelos distintos foi de 6,4. As populações de *B. antiacantha* apresentaram uma forte estruturação populacional ($G_{ST} = 0,219$) e um alto coeficiente de endocruzamento ($F_{IS} = 0,539$), com baixo fluxo gênico entre elas. *Bromelia antiacantha* tem um baixo

recrutamento de sementes, alta taxa de reprodução clonal, que podem estar influenciando nos índices de diversidade e aumentando as diferenças genéticas entre as populações, embora ocorra preferencialmente fecundação cruzada. As populações de *B. antiacantha* apresentaram grande diversidade fenotípica considerando os caracteres avaliados (**Capítulo 5**), entretanto não há uma clara identidade considerando cada população. As folhas e brácteas apresentaram diferenças na produção de flavonóides e antocianinas nas quatro populações estudadas. O levantamento etnobotânico demonstrou que algumas comunidades rurais utilizam a planta, sendo que a porção mais utilizada, segundo os entrevistados, é o fruto para o preparo de xarope para doenças respiratórias. *Bromelia antiacantha* é uma espécie com forte potencial para exploração de seus recursos fitoterápicos, é uma planta de fácil cultivo, com alta viabilidade das sementes e reprodução clonal. As populações estudadas apresentaram diferenças genéticas intra e inter-populacionais. Desta forma, é extremamente importante que haja a conservação das mesmas, visando não só a conservação do próprio germoplasma, mas também a seleção de genótipos superiores para cultivo e / ou melhoramento genético.

Abstract

The bromeliads are plants typical of the New World and have been widely used for various purposes, like ornaments, fiber, fodder, food, therapeutic and others. *Bromelia antiacantha* Bertoloni is found in moist soils of forest, restinga and secondary vegetation. It ranges from Espírito Santo state, Brazil, to Uruguay. It is a polyploid species, partially self-incompatible, pollinated by hummingbirds, with high clonal reproduction. The fruits are edibles berries with phytotherapeutic properties which have been commonly used in folk medicine in the preparation of syrup for breathing problems. In order to start studying genetic diversity in *B. antiacantha*, two microsatellites loci were development (**Chapter 3**). The primers were tested in 51 individuals from two populations and according to the allele's amplification pattern we can conclude that *B. antiacantha* is an autopolyploid species. Patterns of genetic diversity and population structure were studied using five microsatellite *loci* along the coastal lowland of Rio Grande do Sul and one population of Santa Catarina State, totalizing 167 individuals sampled in seven populations (**Chapter 4**). The main results indicated a relatively high expected heterozygosity ($H_E = 0.705$), with a deficit of heterozygotes, when compared with observed heterozygosity values ($H_O = 0.337$). The averaged allelic richness was 1.83 and the number of individuals with four different alleles was 6.4. *Bromelia antiacantha* showed strong population structure ($G_{ST} = 0.219$) and high coefficient of inbreeding ($F_{IS} = 0.539$), with low gene flow among populations. *Bromelia antiacantha* has low seed recruitment, high clonal reproduction rate, which may be influencing the diversity index and the high genetic differences among populations, although

cross-fertilization occurs preferentially. Populations of *Bromelia antiacantha* displayed great phenotypic diversity for those characters evaluated (**Chapter 5**), however there is no clear identity considering each population. Leaves and bracts exhibited differences deviation in the production of flavonoids and anthocyanins in the four populations studied. Ethnobotanical survey proved that people use the plant and the most used portion, according to interviewee, it is the fruit for preparing syrup for respiratory diseases. *Bromelia antiacantha* is a species with great potential to explore its phytotherapeutic resources easy cultivation, with high seed viability and clonal reproduction. In addition, the genetic diversity showed within and among populations, is a important factor which must be considered concerning the species conservation and the selection of superior genotypes for cultivation and / or improvement.

Capítulo 1

Introdução Geral

1. Introdução

1.1 A Família Bromeliaceae

O Brasil é o centro de diversidade de bromélias, onde podemos encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas. As bromélias são ervas perenes que combinam uma grande variação de formas, cores e tamanhos. São encontradas praticamente em todos os ambientes, desde o nível do mar até os elevados altiplanos da cordilheira dos Andes, em locais úmidos como a Mata Atlântica, ou regiões áridas como a Caatinga. Podem ser terrestres, terrestres ocasionais, rupículas, saxícolas ou epífitas, mas nunca parasitas. Nas espécies epífitas as raízes têm apenas função de fixação, enquanto nas terrestres atuam na fixação e na absorção de água (Coffani-Nunes, 2002). Atualmente são conhecidas cerca de 3000 espécies de bromélias (Benzing, 2000), distribuídas em aproximadamente 56 gêneros. A família Bromeliaceae está dividida em três subfamílias: Bromelioideae (~650 sp.), Pitcairnioideae (~890 sp.) e Tillandsioideae (~1000 sp.) (Luther, 2004).

As bromélias são plantas típicas do Novo Mundo, com distribuição geográfica com limite norte de ocorrência nos estados da Virgínia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos, e limite sul no norte da Patagônia, na Argentina. A única exceção é *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr., localizada no Oeste da África, na região da Guiné (Porembsky & Barthlott, 1999), o que parece ter sido um evento de recente dispersão a longa distância (Givnish *et al.*, 2004).

Há muito tempo espécies da família Bromeliaceae vêm sendo utilizadas pelos povos nativos das Américas, estando fortemente presentes em suas culturas. Atualmente, mais de 90 espécies são utilizadas, no mundo todo, para diversos fins: fibras, forragem, alimentação humana, rituais místicos, combustíveis, ornamentação, medicinais, cosméticos entre outros (Bennett *et al.*, 2001). Entretanto, o interesse pelo cultivo de bromélias para a comercialização é muito recente, datando do início dos anos 1990 (Bered *et al.*, 2008). A crescente demanda de mercado tem sido responsável pelo aumento na produção e comercialização de bromélias. No entanto, um considerável aumento no extrativismo ilegal, especialmente daquelas espécies com ciclos de vida longos, vem reduzindo drasticamente muitas populações de espécies oriundas, principalmente, da Mata Atlântica (Coffani-Nunes, 2002).

As bromélias são plantas com alto apelo ornamental, devido a sua aparência peculiar, porém pouco se conhece sobre aspectos básicos, como o modo de reprodução, estrutura genética, padrões filogeográficos, fluxo gênico entre as populações. Considerando que boa parte das informações sobre a família provém de colecionadores, e a bibliografia científica é restrita, são necessários estudos para elucidar a evolução dessas plantas.

1.2 *Bromelia antiacantha* Bertoloni – histórico

Bromelia antiacantha (Figura 1.B), conhecida popularmente como bananinha-do-mato, pertence à subfamília Bromelioideae, é uma planta terrícola, estolonífera, de até um metro de altura. As folhas são lineares e compridas, atingindo mais de um metro de comprimento e possuem as

margens densamente cobertas com espinhos (Smith & Downs, 1979). Os frutos são bagas, verdes quando imaturas e amarelas quando maduras, as quais podem se assemelhar a pequenas bananas (Jorge & Ferro, 1993) (Figura 1.D). A sua distribuição estende-se desde o Uruguai até o Espírito Santo, Brasil (Smith & Downs, 1979). Os espécimes são encontrados principalmente em solos úmidos de floresta, restinga, e na vegetação secundária, formando densos agrupamentos devido à sua propagação clonal.

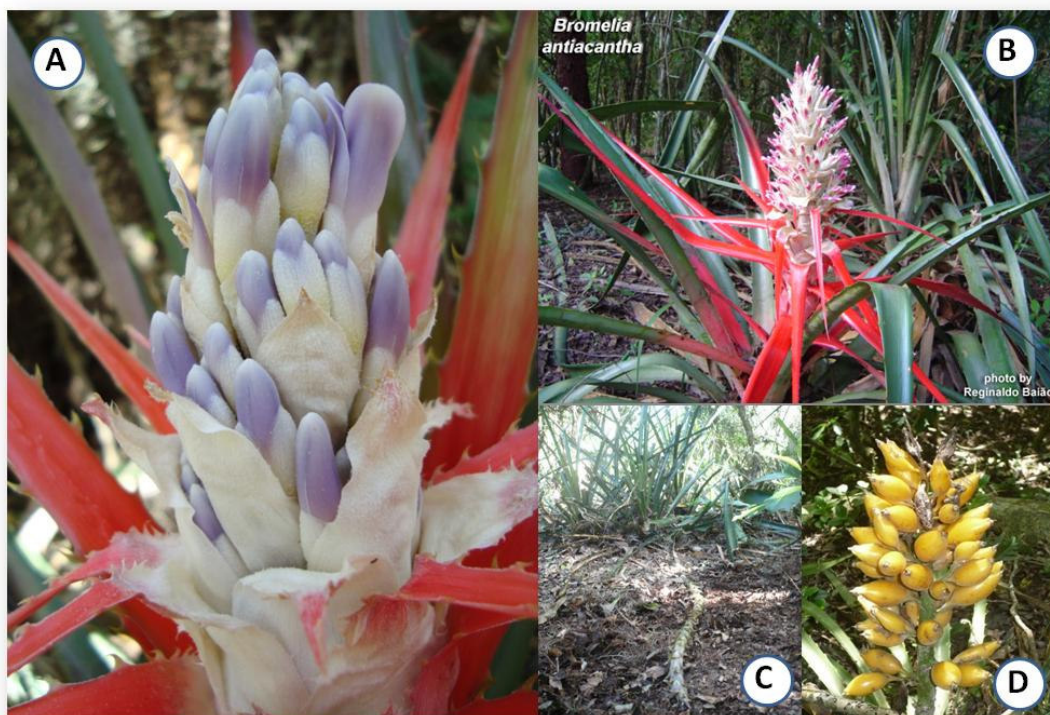


Figura 1. A) Detalhe da inflorescência da *Bromelia antiacantha*; B) Indivíduo de *Bromelia antiacantha*; C) Reprodução clonal, emissão do estolão que dará origem a um *ramet*; D) Infrutescência da *Bromelia antiacantha*.

A inflorescência de *B. antiacantha* possui de 50 a 80 cm de comprimento e de 150 a 350 botões florais (Figura 1.A). Cada inflorescência abre de 10 a 35 flores por dia, durante quatro a cinco dias (Canela & Sazima, 2005). Possui uma estratégia de florescimento do tipo “big-bang”, ou seja, abertura de muitas flores em um curto período de tempo (Gentry, 1974). Durante a estação de florescimento, as brácteas e algumas folhas apresentam uma coloração vermelho intenso (Figura 1.B; Canela & Sazima, 2005). Esta coloração temporária inicia com a floração, e é considerada atrativa para beija-flores (Stiles, 1981), característica recorrente em muitas espécies de bromélias polinizadas por aves (Martinelli, 1997; Sazima *et al.*, 2000; Canela & Sazima, 2003, 2005).

Bromelia antiacantha foi descrita como uma espécie de fecundação cruzada predominante (Canela & Sazima, 2005). Estes mesmos autores, após a realização de experimentos de polinização manual, observaram que 92% das flores produziram frutos após fecundação cruzada, por outro lado, apenas 14% de frutos foram formados após autofecundação. Sob condições naturais, ocorreu formação de frutos em 50% das flores amostradas.

O número cromossômico básico para a família Bromeliaceae é $x = 25$ (Marchant, 1967). A família mantém alta homogeneidade no número somático, $2n = 50$, com espécies apresentando $2n = 100$ e $2n = 150$ já retratadas (Sharma & Gosh, 1973; Cotias-de-Oliveira *et al.*, 2000; Palma-Silva *et al.*, 2004; Gitaí *et al.*, 2005). Segundo Gitaí (2004), *B. antiacantha* é poliplóide, com $2n =$ ca 100, com cromossomos pequenos, esferóides ou bastoniformes, de tamanhos homogêneos.

Estudos de caracterização demográfica realizados por Duarte *et al.* (2007) revelaram que ocorreu um aumento no número médio de plantas por hectare de 1255, em dezembro de 1998, para 2192, em dezembro de 2002. Estas novas plantas eram provenientes principalmente da regeneração via propagação clonal em comparação com as plantas de reprodução sexual, indicando que ocorreu a entrada de 816 plantas por hectare. Segundo os mesmos autores, *B. antiacantha* possui um baixo recrutamento de sementes, formando 367 brotações por hectare, enquanto apenas 5 plântulas ha⁻¹ são provenientes de reprodução sexuada. Os mesmo autores observaram que o número médio de indivíduos vegetativos por hectare é quinze vezes maior do que o número médio dos indivíduos reprodutivos por hectare. Segundo Cogliatti-Carvalho & Rocha (2001), a taxa de reprodução vegetativa de uma espécie está relacionada ao grau de distúrbio do sítio e ao espaço disponível. Habitats que sofreram algum tipo de distúrbio, como queimada ou desmatamento, favorecem a proliferação vegetativa de plantas, pois elas podem recobrir a área do distúrbio mais rapidamente, já que o ambiente encontra-se inóspito para reprodução sexuada (Janzen, 1980). Estes aspectos podem explicar a baixa taxa de regeneração natural via reprodução sexuada e a alta taxa de brotações encontrados por Duarte *et al.* (2007) para *B. antiacantha*, uma vez que a área de estudo sofreu cortes seletivos no passado e por ser uma espécie pioneira adaptada à ambientes inóspitos.

Quanto aos aspectos químicos, segundo Jorge & Ferro (1993), os frutos de bananinha-do-mato são ricos em compostos de natureza fenólica (taninos), e apresentam flavonóides. Nakamura (1972) verificou que as folhas e frutos de *B. antiacantha* são fontes de bromelina, uma enzima proteolítica de grande

importância farmacêutica, sendo utilizada como agente anticancerígeno, modulador imunológico, com propriedades digestivas, anti-inflamatórias, entre outras.

1.3 *Bromelia antiacantha* Bertoloni – potencial econômico

Bromelia antiacantha reúne, em uma única espécie, um potencial múltiplo. Apresenta características medicinais, alimentícias, ornamentais e industriais. Algumas das utilizações desta espécie incluem a fabricação de fibras para tecidos, cordoaria e fabricação de sabão (Duarte *et al.*, 2007). Esta espécie também pode ser utilizada como planta ornamental, cerca viva (impenetrável para o gado) e na extração de fibras (Jorge & Ferro, 1993). Segundo Reitz (1983), sua utilização na medicina popular é descrita desde a década de 40, apresentando propriedades anti-helmínticas, antitussígenas e no tratamento de cálculos renais. Os frutos são comestíveis e saborosos, além de serem utilizados na forma de xarope contra tosse, bronquite e asma (Reitz, 1983). Segundo Duarte *et al.* (2007), um levantamento etnobotânico realizado no interior do Paraná, mostrou que agricultores utilizam os frutos de *B. antiacantha* para a confecção de xaropes para tratamento de doenças do sistema respiratório. Levando em consideração todo o potencial econômico da bananinha-do-mato, conforme descrito acima, torna-se importante desenvolver estratégias para a utilização e conservação destes recursos.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar a variabilidade genética, química e morfológica de populações naturais de *Bromelia antiacantha*. Os dados obtidos contribuirão para elucidar aspectos evolutivos da espécie e poderão ser utilizados para o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentável, criação de futuros programas de melhoramento e aproveitamento das propriedades fitoterápicas já descritas para a bananinha-do-mato.

Objetivos Específicos

- Desenvolver marcadores moleculares do tipo microssatélites para *Bromelia antiacantha* (Capítulo 3);
- Descrever a variabilidade genética e a estruturação populacional de *Bromelia antiacantha* da planície litorânea do Rio Grande do Sul utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites (Capítulo 4);
- Caracterizar populações de *Bromelia antiacantha* do Parque Estadual de Itapuã considerando caracteres de fruto e folha, viabilidade das sementes e análise química de flavonóides (Capítulo 5);
- Avaliar a utilização de *Bromelia antiacantha* pela comunidade rural (Capítulo 5).

Capítulo 3

Isolamento e caracterização de *loci* de microssatélites de *Bromelia antiacantha* Bertoloni (Bromeliaceae), uma espécie autotetraplóide

3.1 Introdução

Os microssatélites, ou “simple sequence repeats” (SSRs) são *loci* que compreendem arranjos de pequenos motivos de um a seis pares de bases (pb) dispostos lado a lado, encontrados em genomas procarióticos e eucarióticos. Eles estão presentes em regiões codificantes e não codificantes e são caracterizados por um alto grau de polimorfismo (Saghai-Marooft *et al.*, 1994; Morgante & Oliveri, 1993).

Os microssatélites representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais, geralmente adições ou deleções de um número integral de repetições, com taxas muito mais elevadas do que aquelas observadas em sequências de DNA não repetitivo (Jarne & Lagoda, 1996). A instabilidade dos SSRs resulta em *loci* polimórficos que são utilizados em estudos de diversidade genética, identidade de germoplasma, caracterização da dinâmica de populações, determinação de gêneros, questões relacionadas à paternidade e comparações entre espécies (Thomas & Scott, 1993; Yang *et al.*, 1994; Rongwen *et al.*, 1994; McDonald & Potts, 1997). O uso de tais marcadores permite esclarecer, também, questões relacionadas ao sistema de cruzamento, especialização ecológica e capacidade de colonização de populações (Boneh *et al.*, 2003).

Os SSRs têm sido isolados e caracterizados em inúmeras espécies de plantas e animais (Tautz, 1989; Wang *et al.*, 1994). Estas sequências são altamente polimórficas e espécie-específicas, sendo que as regiões contendo os SSRs são amplificadas por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), o que tem difundido a sua utilização (Edwards *et al.*, 1996). Existem diferentes

técnicas para o isolamento de SSRs (Wu *et al.*, 1994; Cifarelli *et al.*, 1995; Karagoyozov *et al.*, 1993; Armour *et al.*, 1994; Kijas *et al.*, 1994) e revistas específicas para a sua publicação (Molecular Ecology Resources, Animal Genetics e Conservation Genetics), as quais promovem o desenvolvimento e utilização ainda maior destes marcadores.

Na técnica tradicional de isolamento de *loci* de SSRs, o DNA genômico é fragmentado por enzimas de restrição ou por sonicação. Esses fragmentos são clonados, a seleção dos clones positivos é feita por hibridização, utilizando sondas contendo repetições de di, tri ou tetranucleotídeos em membranas de nylon. As colônias positivas são isoladas, para posterior sequenciamento dos fragmentos e desenho dos “primers”. O número de clones contendo microssatélites que são obtidos por meio do método tradicional usualmente fica próximo a 12% ou menos, chegando a até 0,4% de aproveitamento (Zane *et al.*, 2002). Este método é muito laborioso e estratégias alternativas têm sido desenvolvidas para reduzir o tempo e aumentar a sua eficiência.

Uma estratégia muito eficiente de isolamento de SSRs utiliza bibliotecas enriquecidas de microssatélites (Karagoyozov *et al.*, 1993; Armour *et al.*, 1994; Kijas *et al.*, 1994), através da hibridização seletiva utilizando sondas de oligonucleotídeos de repetições em “tandem”. A sonda pode ser ligada à membrana de nylon ou pode ser biotinizada e ligada a esferas magnéticas (Zane *et al.*, 2002). A utilização de bibliotecas enriquecidas de SSRs tem aumentado a eficiência para 20 a 90%, tanto em plantas quanto em animais, utilizando sondas di-, tri- e tetranucleotídicas, além de reduzir os custos do “screening” (Billotte *et al.*, 1999).

Como os microssatélites são espécie-específicos, os “primers” que delimitam as ilhas de SSRs exigem alto grau de homologia com as seqüências de DNA para as quais eles foram desenhados. Até o momento, para a família Bromeliaceae, alguns trabalhos foram publicados, no entanto, apenas para espécies das subfamílias Tillandsioideae (Boneh *et al.*, 2003; Palma-Silva *et al.*, 2007) e Pitcairnoideae (Sarhou *et al.*, 2003; Paggi *et al.*, 2008). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi isolar um conjunto de *loci* de SSR para *B. antiacantha* (Bromelioideae).

3.2 Materiais e Métodos

A biblioteca de microssatélites de *B. antiacantha* foi desenvolvida no Laboratório de Análise Genética e Molecular (CBMEG), na Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil, na disciplina “Construção de bancos enriquecidos de microssatélites em eucariotos: um curso prático e teórico”, oferecida pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular daquela Universidade.

O DNA genômico total de *B. antiacantha* foi extraído de folhas frescas segundo o protocolo descrito por Doyle & Doly (1990). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e posteriormente digerido com a enzima de restrição *RsaI*. Foram ligados adaptadores às extremidades dos fragmentos reconhecidas pela enzima. A biblioteca foi enriquecida utilizando como sondas as repetições (CT)₈ e (GT)₈ biotinizadas e ligadas à esferas magnéticas como descrito por Kijas *et al.* (1994) com modificações de Billote *et al.* (1999). Os fragmentos selecionados foram

amplificados por PCR usando “primers” complementares aos adaptadores e posteriormente ligados ao vetor pGEM-T *Easy* (Promega). Os plasmídeos foram introduzidos em células competentes XL-1 Blue (*Escherichia coli*). As colônias transformadas foram cultivadas em meio contendo ampicilina e X-galactosidase. Para a obtenção das sequências foi utilizando o kit de sequenciamento BigDye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems) no sequenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas com o “software” WEBTROLL (<http://wsmartins.net/webtroll/troll.html>) para localizar os microssatélites. Para o alinhamento das sequências “forward” e “reverse” que continham motivos de SSR foi utilizado o “software” SEQUENCHER versão 4.1.2 (Gene Codes) e os “primers” foram desenhados utilizando o programa PRIMER3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

As amplificações via PCR foram inicialmente feitas com dez indivíduos de cada população e a reação final continha: 10ng de DNA genômico, 1x do tampão da enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 10pM de cada *primer* (“Foward” e “Reverse”), e 0,5 unidade de Taq polimerase (GoTaq, Promega), com um volume final de 10µl. As reações foram feitas no termociclador TC – 412 (Techne). O protocolo das amplificações para SSR foi realizado segundo Palma-Silva *et al.* (2007) através de programa do tipo “touchdown”. O produto das amplificações foi separado por eletroforese em gel de agarose de alta resolução (Agarose 1000, Life Technologies) a 4,0% e corado com brometo de etídio. As amplificações foram comparadas com marcador de peso molecular de 50pb (LGC Biotecnologia) para determinação dos alelos. O tamanho dos

fragmentos foi confirmado em sequenciador automático (ABI 3700, Applied Biosystems).

Após o isolamento e desenvolvimento dos *loci* de SSR, os mesmos foram testados em 51 indivíduos de duas populações de *B. antiacantha* (Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS) para determinar o padrão de polimorfismo. O programa AUTOTET (Thrall & Young, 2000), específico para organismos poliplóides, foi utilizado para estimar a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), o coeficiente de endocruzamento e para verificar se os *loci* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises levaram em consideração a presença de múltiplos heterozigotos parciais (AAAB, AABB, AABC), além do heterozigoto total (ABCD). Outra particularidade do programa é a obtenção da estimativa da heterozigosidade esperada considerando segregações cromossômica [$H_E(Ce)$] e cromatídica [$H_E(Cd)$] ao acaso. A segregação cromatídica é produzida se ocorrer dupla redução, por exemplo, as cromátides irmãs segregam no mesmo gameta, um fenômeno característico de autopoliplóides e que depende da quantidade de tetravalentes formados e da proximidade do *locus* do centrômero (Bever & Felber, 1992; Ronfort *et al.*, 1998). Como não se sabe a taxa de dupla redução em *B. antiacantha*, foi assumido apenas a ocorrência da segregação cromossômica.

3.3 Resultados e Discussão

Foram construídas três bibliotecas enriquecidas com microssatélites para *B. antiacantha*, das quais um total de 288 colônias recombinantes foram obtidas e 144 clones foram sequenciados. Foram encontradas 26 sequências

contendo motivos de microssatélites, a partir dos quais, 12 primers foram desenhados, sendo que dois amplificaram satisfatoriamente, *loci* Ba02 e Ba06. Foi observada uma baixa eficiência no enriquecimento da biblioteca de SSR em *B. antiacantha* (1,38%). A porcentagem obtida é muito próxima à encontrada em bibliotecas construídas através do método tradicional em plantas, 2,3%, que pode variar entre 0,059 a 5,8% (Zane *et al.*, 2002). Diferentes motivos para a baixa eficiência no enriquecimento da biblioteca nesta espécie podem ser considerados. Pode ser uma limitação da técnica, pela utilização de uma quantidade não adequada de tampão SSC ou outro reagente utilizado, também pode ter ocorrido o não anelamento da sonda as regiões de SSRs. Outro fator que pode estar influenciando é o fato de tratar-se de uma espécie vegetal, o seu DNA pode conter algum composto secundário que inibe o enriquecimento, além disso, o fato de ser uma espécie poliplóide também pode influenciar negativamente, apesar de inúmeras bibliotecas já terem sido desenvolvidas para plantas poliplóides (Truong *et al.*, 2005; Bon *et al.*, 2005).

O padrão observado na resolução das ampliações em gel de agarose de alta resolução corrobora a afirmação de que *B. antiacantha* é uma espécie poliplóide (Gitaí, 2004). Podemos concluir ainda, que provavelmente esta espécie é autopoliplóide, com até quatro alelos sendo encontrados por indivíduo. Não foi possível estimar o número exato de cópias de cada alelo em indivíduos com menos de quatro alelos amplificados, pois a intensidade das bandas nos géis de agarose não segue um padrão claro, e o erro esperado seria grande.

O número de alelos por *locus* foi quatro para o *locus* Ba02 e seis para o *locus* Ba06 (Tabela 1). A heterozigosidade observada nos *loci* foi de 0,329 e 0,408, com uma média de 0,369 (Tabela 2). Os dois *loci* mostraram uma diferença significativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,001$), demonstrando um déficit de heterozigotos. A heterozigosidade esperada média foi de 0,746, com um coeficiente de endocruzamento médio de 0,506 (Tabela 2). A heterozigosidade observada foi bem menor que a esperada e o coeficiente de endocruzamento foi alto, o que demonstra um excesso de homozigotos.

Os valores de heterozigosidade obtidos e esperados para *B. antiacantha* foram muito próximos aos encontrados por Palma-Silva (2008), para a espécie *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), uma espécie diplóide com ampla distribuição, através da análise de SSRs ($H_O = 0,424$ e $H_E = 0,714$). Barbará *et al.* (2007)b também estudaram a diversidade genética de oito populações de duas espécies de bromélias, *Alcantarea imperialis* e *A. geniculata*. A heterozigosidade observada foi igual a 0,362 e 0,357, respectivamente. A heterozigosidade esperada foi de 0,615 para *A. imperialis* e de 0,429 para *A. geniculata*. Apesar dos valores de heterozigosidade observada serem relativamente altos, eles são diferentes dos esperados, o que demonstra que há um déficit de heterozigotos nessas espécies.

Tabela 1. Sequência dos “primers” e características dos *loci* de microssatélites desenvolvidos para *Bromelia antiacantha*, incluindo o nome do *locus*, a sequência dos “primers”, o tipo de repetição, número de alelos e o tamanho dos fragmentos em pares de bases.

Loci	Sequência	Repetição	N° alelos	bp
Ba02	F: CAACCAATCAGAGCGCAATA R: GACCACGCGTCTCCAAAATA	(TG) ₉ TTT(GA) ₁₅	4	150
Ba06	F: AAACATGTTCCCCCTTACCC R: AAGAAACCGGACGCTGTATG	(TC) ₂₇	6	230

Tabela 2. Caracterização da diversidade genética das populações de *Bromelia antiacantha* observadas nos dois *loci* de SSR. A = riqueza alélica; Ai = riqueza alélica dentro do indivíduo; G = número médio de indivíduos com quatro alelos distintos; H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; F_{IS} = coeficiente de endocruzamento.

Loci	A	Ai	G	H_O	H_E	F_{IS}
Ba02	4	1,857	12	0,329	0,682	0,518
Ba06	6	2,039	16	0,408	0,809	0,495
Média	5	1,984	14	0,369	0,746	0,506

Capítulo 4

Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Bromelia antiacantha* Bertoloni (Bromeliaceae)

4.1 Introdução

A variabilidade genética encontrada em populações naturais está diretamente relacionada com aspectos da história de vida da espécie e pode fornecer informações importantes com implicações na biologia evolutiva, ecologia e biologia da conservação. Entre os aspectos de vida mais importantes destacam-se o sistema de cruzamento e os mecanismos de dispersão de sementes (Hamrick & Loveless, 1986). Ao contrário das espécies alógamas, as autógamas tendem a apresentar baixos níveis de variabilidade dentro das populações e elevada divergência genética entre as mesmas. Da mesma forma, populações de espécies que apresentam reprodução clonal geralmente apresentam níveis de variabilidade semelhantes às de plantas autógamas (Fischer *et al.*, 2000). Além disso, segundo Soltis & Rieseberg (1986), estudos eletroforéticos em espécies autopoliplóides sugerem que a heterozigiosidade é significativamente maior nessas populações em comparação com as diplóides, devido a sua herança tetrassômica. Tal fenômeno também poderá influenciar no grau de diversidade genética estimada dentro e entre populações.

Informações sobre a variabilidade genética dentro e entre populações, assim como o conhecimento do germoplasma existente de uma determinada espécie, são extremamente importantes, pois podem servir como base para a utilização e conservação dos recursos genéticos disponíveis (Handa, 1998). Além disso, a caracterização de germoplasma tem papel fundamental para o futuro melhoramento genético das espécies.

Os trabalhos publicados sobre a diversidade genética de populações de espécies da família Bromeliaceae ainda são escassos, principalmente no que se refere à utilização de marcadores do tipo microssatélites. A maior parte dos trabalhos com este enfoque utilizaram marcadores do tipo isoenzimas, RAPD ou AFLP (Soltis *et al.*, 1987; Murawski & Hamrick, 1990; Ruas *et al.*, 1995; Izquierdo & Piñero, 1998; Zizka *et al.*, 1999; Izquierdo & Piñero, 2000; González-Astorga *et al.*, 2004; Sgorbati *et al.*, 2004; Cavallari *et al.*, 2006). Os primeiros *loci* de microssatélites desenvolvidos para Bromeliaceae foram descritos por dois grupos independentes, Boneh *et al.* (2003) e Sartou *et al.* (2003), para três espécies de bromélia, *Tillandsia fasciculata*, *Guzmania monostachia* e *Pitcairnia geyskesii*. Estudos de diversidade e estrutura genética utilizando a amplificação heteróloga destes marcadores em outras espécies foram realizados com sucesso (Barbará *et al.*, 2007b, 2009; Paggi, 2006; Palma-Silva 2008). No entanto, a descrição de novos “primers” específicos para outras espécies de bromélias é importante para que um número maior de estudos com este enfoque possa ser realizado. Até o momento, nossa equipe isolou 25 *loci* de microssatélites para diferentes espécies (*Vriesea gigantea* e *Alcantarea imperialis*, Palma-Silva *et al.*, 2007; *Pitcairnia albiflos*, Paggi *et al.*, 2008; *Bromelia antiacantha*, Zanella, C., nesta dissertação, Capítulo 3).

Os *loci* de microssatélites são espécie-específicos, sendo necessário isolá-los para cada espécie. Porém a presença de regiões flaqueadoras conservadas nos microssatélites permite a amplificação desses *loci* em espécies próximas. O alto grau de polimorfismo observado na espécie em que os *loci* foram descritos pode ocasionalmente não ser observado em espécies relacionadas, especialmente quando aumenta a distância evolutiva entre as

mesmas (Rubinsztein *et al.* 1995; Morin *et al.* 1998). No caso da família Bromeliaceae, para a qual existem relatos de ampla radiação adaptativa acarretando em baixos níveis de divergência nas sequências de DNA, os marcadores são transferíveis entre espécies da mesma subfamília e até entre as subfamílias (Palma-Silva *et al.*, 2007; Barbará *et al.*, 2007a, 2009; Paggi *et al.*, 2008).

Bromelia antiacantha pertence à subfamília Bromelioideae, é uma espécie terrícola, estolonífera, de até um metro de altura, seus frutos são bagas, as quais podem se assemelhar a pequenas bananas (Jorge & Ferro, 1993). A sua distribuição estende-se desde o Uruguai até o Espírito Santo, Brasil (Smith & Downs, 1979). Ocorre principalmente nos solos úmidos da floresta, restinga, e na vegetação secundária, formando sempre densos agrupamentos devido à sua propagação clonal. *Bromelia antiacantha* foi descrita como sendo uma espécie predominantemente de fecundação cruzada (Canela & Sazima, 2005), com estratégia de florescimento do tipo “big-bang”, ou seja, abertura de muitas flores em um curto período de tempo (Gentry, 1974). Segundo Gitaí (2004), *B. antiacantha* é poliplóide, com $2n = ca\ 100$, com cromossomos pequenos, esferóides ou bastoniformes, de tamanhos homogêneos.

A poliploidização é considerada uma importante forma de surgimento de novas espécies, sendo um recurso significativo na evolução das plantas (Stebbins, 1980). A ocorrência de poliplóides entre as angiospermas varia de 30 a 80% (Otto & Whitton, 2000; Soltis & Soltis, 2000). Muitos fatores contribuem para o sucesso adaptativo de organismos poliplóides, como o aumento da heterozigosidade e diversidade genética, multiplicidade enzimática

e aumento na diversidade bioquímica (Levin, 1983; Soltis & Soltis, 2000), sendo que o seu estabelecimento na natureza pode ser favorecido por reprodução vegetativa e hábito perene (Otto & Whitton, 2000; Soltis & Soltis, 2000).

Dois principais tipos de poliplóides são encontrados na natureza, alopoliplóides e autopoliplóides (Stebbins, 1947; Soltis & Soltis, 2000). Alopoliploidia é resultante da hibridação interespecífica e subsequente duplicação cromossômica, já o autopoliplóide é consequência da poliploidização de um único indivíduo, geralmente pela fusão de gametas não reduzidos. Alopoliplóides são caracterizados por uma herança dissômica, formação de bivalentes durante a meiose e heterozigosidade fixada (sem segregação). Os organismos autopoliplóides normalmente expressam uma herança polissômica, podendo formar multivalentes durante a meiose, com a formação de dois tipos de heterozigotos: balanceados e não balanceados (López-Pujol *et al.*, 2004).

O objetivo geral do presente trabalho foi estimar a diversidade e estrutura genética de populações de *B. antiacantha* da planície costeira do Rio Grande do Sul utilizando *loci* de microssatélites. Mais especificamente, o trabalho objetivou: a) descrever os níveis de variabilidade genética dentro e entre as populações e inferir se há estruturação entre as mesmas; b) identificar padrões moleculares relacionados ao tipo de poliploidia (alo ou autopoliploidia) de *B. antiacantha*.

4.2 Materiais e Métodos

Área de estudo

Foram amostrados 167 indivíduos de *Bromelia antiacantha* em sete populações distribuídas ao longo da planície costeira do Rio Grande do Sul e em uma população de Santa Catarina (Tabela 1 e Figura 1). As populações amostradas foram: Estação Ecológica do Taim (TM), no município de Santa Vitória do Palmar, com um ambiente de restinga e campos; Arambaré (AR), as margens da Laguna dos Patos, um ambiente de restinga e alta incidência de ventos; Parque Estadual de Itapuã, Viamão (Lagoa Negra – LN, com solo arenoso e vegetação típica de restinga, com alta incidência luminosa sobre as plantas; e Trilha do Fenômeno – TF, situada em uma região de mata mais fechada, e solo seco); Osório (OSO), na localidade de Estância Velha, num ambiente de restinga e solo arenoso; Maquiné, na localidade de Barra do Ouro (BO), uma área de mata ciliar (Mata Atlântica) e úmida; e na Floresta Nacional de Três Barras (TB), localizada entre os municípios de Três Barras e Canoinhas, Santa Catarina, com uma vegetação típica de Floresta Ombrófila Mista.

Bromelia antiacantha tem uma alta reprodução clonal e os indivíduos foram coletados com no mínimo 10m de distância com o objetivo de evitar a amostragem do mesmo indivíduo (clone). Folhas jovens foram coletadas e estocadas em nitrogênio líquido até a extração de DNA.

Extração de DNA e caracterização molecular

O DNA genômico total foi extraído segundo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990). As extrações de DNA foram quantificadas em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio, em comparação com DNA de fago λ . Foram testados todos os “primers” descritos para a família Bromeliaceae (Boneh *et al.*, 2003; Sartou *et al.*, 2003; Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008), além dos descritos para *Bromelia antiacantha* (Capítulo 3). Após o “screening” inicial, foram selecionados cinco “primers” para a continuação do trabalho. Dois descritos para *Bromelia antiacantha* (Ba02 e Ba06, Capítulo 3), dois descritos para *Pitcairnia albiflos* (PaD07 e PaZ01 – Paggi *et al.*, 2008) e um para *Vriesea gigantea* (VgF05 – dados não publicados). As amplificações via PCR foram realizadas no termociclador TC – 412 (Techne) contendo: 10ng de DNA genômico, 1x do tampão da enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 10pM de cada *primer* (“Foward” e “Reverse”), e 0,5 unidade de Taq polimerase (GoTaq, Promega), com um volume final de 10 μ l. O protocolo de amplificação utilizado foi do tipo “touchdown”, descrito por Palma-Silva *et al.* (2007). Para a genotipagem, inicialmente foram realizados testes em géis de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata. Entretanto, por tratar-se de uma espécie poliplóide os géis ficaram de difícil leitura, além da presença de bandas fantasmas típicas das amplificações de *loci* de microsatélites. Dessa forma, o produto das amplificações foi separado por eletroforese em gel de agarose de alta resolução (Agarose 1000, Life Technologies) a 4,0%, e corado com brometo de etídio. As amplificações foram comparadas com marcador de peso molecular de 50pb (LGC Biotecnologia) para determinação do tamanho dos alelos. Inicialmente, a genotipagem

realizada no gel de agarose foi comparada com aquela realizada em sequenciador automático (ABI 3700, Applied Biosystems). Os testes realizados confirmaram o tamanho e o número de alelos estimados.

Análise estatística

Para descrever os níveis de diversidade genética, foram calculados os seguintes parâmetros: (1) P – porcentagem de *loci* polimórficos; (2) A – riqueza alélica, a qual representa o número de alelos por *locus*; (3) A_i – riqueza alélica dentro do indivíduo, representando o número médio de alelos por indivíduo por *locus*; (4) G – riqueza genotípica que mede o número de genótipos com quatro alelos por *locus*; (5) H_O – heterozigosidade observada; (6) H_E – heterozigosidade esperada (7) F_{IS} – coeficiente de endocruzamento, calculado como $1 - (H_O/H_E)$, para comparar se as proporções genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). O teste de qui-quadrado (χ^2) foi realizado para avaliar os desvios de F_{IS} de zero. Os parâmetros de diversidade genética foram calculados utilizando o “software” AUTOTET (Thrall & Young, 2000), específico para organismos poliplóides. O “software” DISPAN (Ota, 1993), que também suporta análises para organismos poliplóides, foi utilizado para calcular a partição da diversidade genética dentro e entre as populações, utilizando a estatística de diversidade gênica de Nei (Nei, 1973), através dos seguintes parâmetros: H_T – diversidade gênica total; H_S – diversidade gênica média dentro das populações; D_{ST} – diversidade genética entre populações; e G_{ST} – proporção de diversidade genética total entre as populações. O fluxo gênico (Nm) entre as populações foi estimado pela equação de Wright (Wright, 1951): $Nm = 1 - G_{ST}/4 G_{ST}$. Matrizes de distância genética foram geradas neste

programa segundo a distância genética D entre populações (Nei, 1972). A construção do dendrograma foi realizada através do método UPGMA no programa NT-SYS 2.1 (Rohlf, 2000).

4.3 Resultados

Foram detectados, no total, 22 alelos nos cinco *loci* analisados, com uma média de 4,4 alelos por *locus*, variando de três a seis alelos por *locus* (Tabela 2). Alelos raros (frequência menor que 0,05) estão presentes em três populações (TF, OSO, AR). No *locus* PaZ01 um alelo está fixado na população BO e no *locus* VgF05 há um alelo fixado na população TB. A heterozigosidade observada nas populações, variou de 0,114 a 0,583, com uma média de 0,337 (Tabela 2). A heterozigosidade esperada foi de 0,705, variando de 0,573 a 0,793. O coeficiente de endocruzamento médio (F_{IS}) foi de 0,539. Todos os *loci* mostraram uma diferença significativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($P < 0,001$), com exceção do *loci* PaD07 que apresentou equilíbrio nas populações BO e AR, e o *loci* PaZ01 que também não desviou o HWE nas populações de BO e OSO.

A diversidade genética variou bastante entre as populações analisadas (Tabela 3). A riqueza alélica (A) média foi de 3,97, variando entre 3,2 e 4,4 alelos por *locus*. Quanto à riqueza genotípica (G), a média foi de 6,4 genótipos com quatro alelos por *locus*, variando de 3,6 e 8,8. A riqueza alélica média dentro dos indivíduos foi de 1,83 alelos por indivíduo por *locus*, variando entre 1,51 e 2,18 (Tabela 3). A heterozigosidade observada entre as populações foi de 0,193 a 0,460, com uma média de 0,327 (Tabela 3). A heterozigosidade

esperada variou de 0,363 a 0,661, com média de 0,559. O coeficiente de endocruzamento médio (F_{IS}) foi de 0,412. A população de Barra do Ouro (BO) foi a que apresentou os menores índices de diversidade genética.

A diversidade genética em *B. antiacantha* é mais alta dentro das populações ($H_S = 0,599$), do que entre elas ($D_{ST} = 0,147$); todavia uma significativa fração dessa variabilidade genética foi atribuída a diferenças entre as populações ($G_{ST} = 0,219$), o qual demonstra que elas estão altamente estruturadas (Tabela 4). O número de migrantes por geração foi baixo ($Nm = 1,69$), o que permite inferir que o fluxo gênico entre as populações é limitado.

O dendrograma gerado a partir da matriz de distância genética baseada na distância D (Nei, 1972) demonstrou um agrupamento entre as populações do Parque Estadual de Itapuã (LN e TF), com alta similaridade genética (Figura 3). As populações coletadas mais ao sul da planície costeira do Rio Grande do Sul (ARA e TM) formaram um grupo a parte, revelando uma similaridade bastante alta entre as mesmas. As populações BO e OSO, geograficamente próximas, agruparam-se num terceiro clado. A população de Santa Catarina (TB) agrupou com as da região mais ao sul do RS, mostrando uma similaridade genética, apesar da grande distância geográfica existente entre elas (≈ 600 km).

4.4 Discussão

Segundo Gitaí (2004), *Bromelia antiacantha* possui $2n = ca 100$ cromossomos. Considerando-se a herança codominante dos microssatélites, os padrões de bandas observados nos géis de agarose nos permitiram sugerir

que *B. antiacantha* é uma espécie autopoliplóide (Figura 2), sendo possível identificar indivíduos com três e quatro alelos distintos, indicando a autopoliploidia da espécie (Soltis & Rieseberg, 1986; Soltis & Soltis, 1989; Mahy *et al.*, 2000). López-Pujol *et al.*, (2007) utilizaram dados de aloenzimas, um marcador codominante, para evidenciar que *Delphinium montanum* (Ranunculaceae) é autopoliplóide.

Os valores das heterozigosidades observados em *B. antiacantha* foram muito próximos aos encontrados por Palma-Silva (2008), que estudou a diversidade genética em 13 populações naturais de *Vriesea gigantea*, uma espécie de bromélia diplóide com ampla distribuição, utilizando *loci* de microssatélites como marcador molecular ($H_O = 0,424$ e $H_E = 0,714$). Também, Barbará *et al.* (2007)b estudaram a estruturação genética e o fluxo gênico de oito populações de duas espécies de bromélia perenes e diplóides que habitam elevadas altitudes na mata Atlântica (RJ e MG), *Alcantarea imperialis* e *A. geniculata*, no qual obtiveram uma heterozigosidade observada igual a 0,362 e 0,357, respectivamente. A heterozigosidade esperada foi de 0,615 para *A. imperialis* e de 0,429 para *A. geniculata*. Apesar dos valores de heterozigosidade observada serem relativamente altos, eles são diferentes dos esperados, demonstrando que há um déficit de heterozigotos igualmente nessas espécies.

Altos níveis de heterozigosidade encontrados em autopoliplóides podem ser consequência da herança tetrassômica (Soltis & Soltis, 2000), pois esse modo de herança pode reduzir os efeitos de gargalo de garrafa e deriva genética nas populações. Trabalhos na literatura demonstram níveis elevados de heterozigosidade em plantas autopoliplóides em comparação com espécies

diplóides relacionadas: *Dactylis glomerata* ($H_o = 0,43$ no tetraplóide e $H_o = 0,17$ no diplóide; Soltis & Soltis, 1993), *Rutidosia leptorrhinchoides* ($H_o = 0,34$ no tetraplóide e $H_o = 0,22$ no diplóide; Brown & Young, 2000). A ausência de estudos em espécies diplóides relacionadas à *B. antiacantha* não permite este tipo de comparação, tornando difícil classificar os níveis de diversidade genética da espécie. O único fato que pode ser levado em consideração neste caso é que as populações de *B. antiacantha* estudadas apresentaram um excesso de homozigotos, porém com índices próximos aos encontrados para outras espécies da família Bromeliaceae.

A riqueza alélica observada em *B. antiacantha* ($A_i = 1,83$) foi menor que as obtidas para espécies de bromélias diplóides estudadas por Palma-Silva (2008), *Vriesea gigantea* ($A_i = 2,83$), e por Barbará *et al.* (2007)b, *A. imperialis* ($A_i = 2,48$) e *A. geniculata* ($A_i = 2,36$). López-Pujol *et al.* (2004) estudaram uma espécie tetraplóide de planta endêmica de uma região da Espanha, *Thymus loscosii* (Lamiaceae), a qual possui uma riqueza alélica média igual a 3,0. As populações de *B. antiacantha* amostradas apresentaram um número menor de alelos por *locus* tanto comparando com espécies da mesma família, quanto com espécies com mesmo nível de ploidia, o que evidencia a baixa variabilidade genética na espécie.

As populações de *B. antiacantha* apresentaram valores variados de G_{ST} (Tabela 4), com o valor médio de 0,219, o que indica uma forte estruturação populacional, também observado em outras espécies de Bromeliaceae com reprodução clonal. González-Astorga *et al.* (2004) obtiveram um $F_{ST} = 0,39$ entre populações de *Tillandsia achyrostachys* e alto endocruzamento ($F_{IS} = 0,43$). Por ser uma espécie endêmica, de distribuição restrita e forte reprodução

clonal, a fragmentação do habitat tem reduzido a riqueza alélica e a diversidade genética de *T. achyrostachys*, aumentando a diferença entre as populações. Sgorbati *et al.* (2004) encontraram um $G_{ST} = 0,96$ em *Puya raimondii* (Bromeliaceae), com uma forte estruturação populacional e com baixa diferenciação dentro das populações ($H_S = 0,014$), sendo uma espécie com uma estreita base genética e forte uniformidade das populações. Barbará *et al.* (2007)b, estudando duas espécies de bromélias, encontraram forte estruturação entre populações de *Alcantarea imperialis* ($F_{ST} = 0,434$) e baixo índice de endocruzamento dentro das populações ($F_{IS} = 0,099$). Para *A. geniculata*, os mesmos autores também consideraram uma estruturação alta ($F_{ST} = 0,111$), com baixo grau de endocruzamento ($F_{IS} = 0,094$), verificando um alto grau de isolamento genético entre elas e fluxo gênico baixo, indicando uma ineficiência na polinização.

A população de Barra do Ouro, no município de Maquiné, apresentou os menores índices de diversidade genética, provavelmente por tratar-se de espécimes cultivados na região, no passado. As coletas nesta localidade foram realizadas ao redor das cercas das propriedades, e pela proximidade genética com a população de Osório (Figura 3), acredita-se que esses indivíduos tenham sido trazidos do litoral. Já a população da Lagoa Negra apresentou índices de diversidade genética mais altos, sendo o local com o maior número de genótipos com quatro alelos distintos ($G = 8,8$) e alta heterozigosidade esperada (0,661). A Lagoa Negra está situada no Parque Estadual de Itapuã, uma área de restinga, de preservação ambiental e fechada ao público, com variabilidade genética mais alta entre os indivíduos em comparação com as demais populações. A Trilha do Fenômeno está situada no mesmo parque,

mas em um local, que no passado, sofreu distúrbios ambientais (antiga pedreira) e está em regeneração nos últimos 30 anos, apresentando uma variabilidade genética menor.

Os parâmetros genéticos estimados neste trabalho indicam que há um fluxo gênico baixo entre as populações de *B. antiacantha*, com menos de dois indivíduos migrantes por geração. Por ser uma espécie com alta taxa de reprodução clonal, forte estruturação populacional e altos coeficientes de endocruzamento (F_{IS}), seus índices de diversidade genética são mais baixos em comparação com espécies de fecundação cruzada. Em geral, espera-se que espécies de plantas com fecundação cruzada apresentem pouca diferença entre as populações e baixo nível de endocruzamento (Bodanese-Zanettini e Cavalli, 2003). Segundo Soltis *et al.*, (1987) *Tillandsia ionantha* exibiu baixos valores de F_{ST} (0,043), indicando pouca diferença nas frequências alélicas entre as populações. Apesar de *B. antiacantha* ser uma espécie autotetraplóide (Gitaí, 2004; este estudo), da qual se espera uma diversidade genética alta (Soltis & Soltis, 2000), com grande número de heterozigotos, o que podemos observar é que a reprodução clonal (Jorge & Ferro, 1993), juntamente com o baixo recrutamento de sementes (Duarte *et al.*, 2007) podem estar influenciando nos índices de diversidade, homogeneizando as populações e aumentando as diferenças genéticas entre elas, embora ocorra preferencialmente fecundação cruzada nas populações naturais (Canela & Sazima, 2005).

Tabela 1. Populações de *Bromelia antiacantha* amostradas na Planície Costeira do Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. ID = nome da população, estado, localidade e coordenadas geográficas.

ID	Estado	Localidade	Latitude S	Longitude W
TM	RS	St ^a Vitória do Palmar	31°56'	52°25'
AR	RS	Arambaré	30°50'	51°29'
LN	RS	Viamão – Itapuã	30°04'	51°01'
TF	RS	Viamão – Itapuã	30°21'	51°01'
OSO	RS	Osório	29°53'	50°16'
BO	RS	Maquiné	29°40'	50°12'
TB	SC	Três Barras	26°06'	59°19'

Tabela 2. Caracterização genética em sete populações de *Bromelia antiacantha*. A = riqueza alélica; Ai = riqueza alélica dentro do indivíduo; G = número médio de indivíduos com quatro alelos distintos; H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; F_{IS} = coeficiente de endocruzamento.

Locus	A	Ai	G	H _O	H _E	F _{IS}
Ba06	6	2,36	31	0,509	0,793	0,358
PaD07	3	1,13	6	0,114	0,655	0,825
PaZ01	5	2,47	25	0,583	0,762	0,235
VgF05	4	1,49	6	0,203	0,573	0,646
Ba02	4	1,69	15	0,275	0,743	0,630
Média	4,4	1,83	16,6	0,337	0,705	0,539

Tabela 3. Diversidade genética das populações de *Bromelia antiacantha* observadas com cinco *loci* de SSR. ID = nome da população; N = tamanho amostral; A = riqueza alélica; Ai = riqueza alélica dentro do indivíduo; G = número médio de indivíduos com quatro alelos distintos; H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; F_{IS} = coeficiente de endocruzamento

ID	N	A	Ai	G	H _O	H _E	F _{IS}
TM	27	4	2,13	7,85	0,437	0,657	0,334
ARA	25	4	1,93	7	0,367	0,574	0,361
LN	34	4,4	1,77	8,8	0,307	0,661	0,535
TF	24	4,4	1,6	6,4	0,236	0,625	0,623
OSO	17	4,2	2,18	5,8	0,460	0,537	0,145
BO	15	3,2	1,51	3,6	0,193	0,363	0,467
TB	25	3,6	1,72	5,4	0,288	0,496	0,419
Média/Total	167	3,97	1,83	6,4	0,327	0,559	0,412

Tabela 4. Estatística F para cinco *loci* de SSR em sete populações de *Bromelia antiacantha*. H_T = diversidade genética total; H_S = diversidade genética média dentro das populações; D_{ST} = diversidade genética entre populações; e G_{ST} = proporção de diversidade genética total entre as populações.

Locus	H _T	H _S	D _{ST}	G _{ST}
Ba06	0,786	0,744	0,042	0,053
PaD07	0,646	0,323	0,323	0,499
PaZ01	0,772	0,637	0,135	0,176
VgF05	0,582	0,437	0,145	0,249
Ba02	0,743	0,654	0,089	0,119
Média	0,706	0,559	0,147	0,219

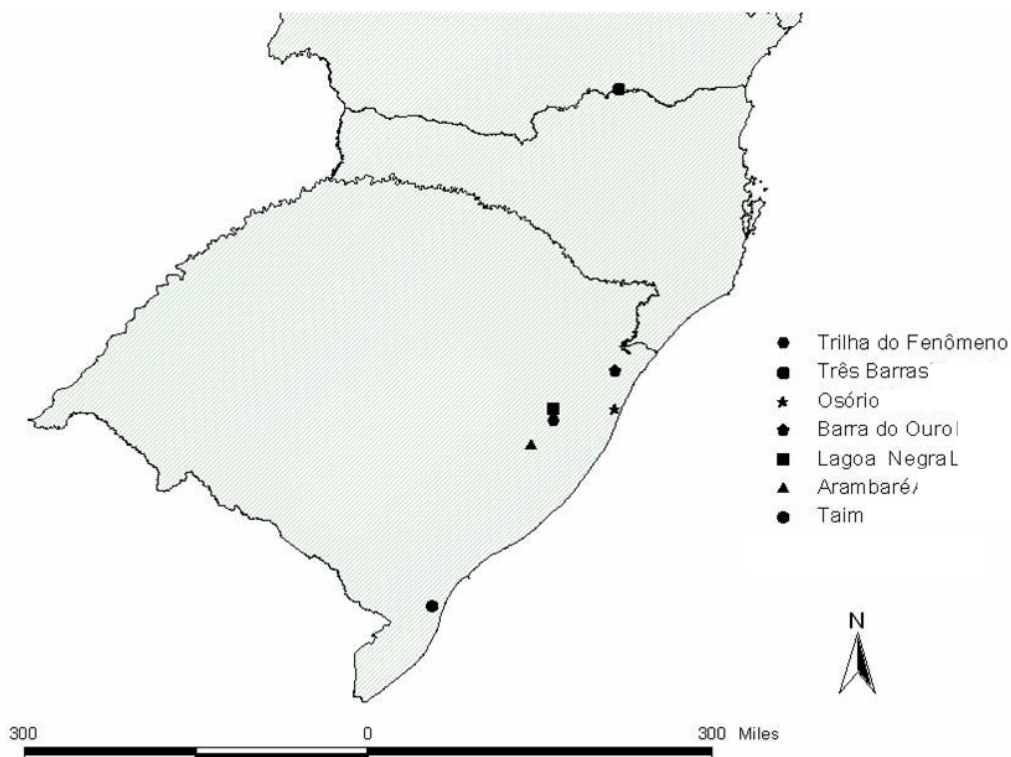


Figura 1. Mapa das populações de *Bromelia antiacantha* amostradas para análise de diversidade genética e estruturação populacional.

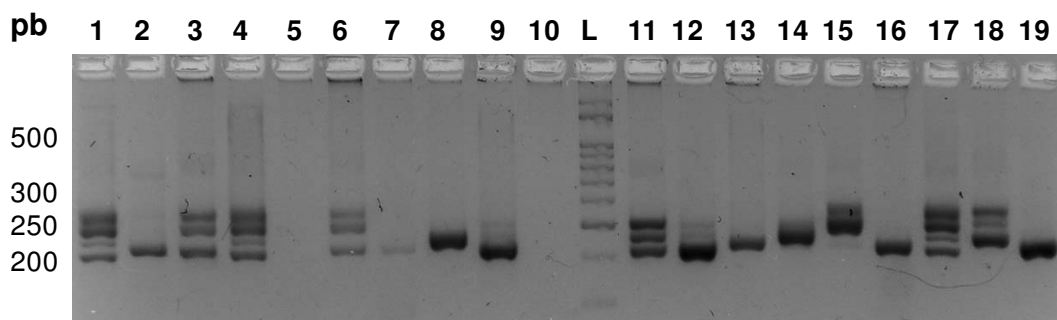


Figura 2. Amplificação do produto de PCR do “primer” Ba06 em 19 indivíduos de *Bromelia antiacantha*, em gel de agarose 4% de alta resolução, mostrando a amplificação de 1 a 4 bandas (alelos) por indivíduo. As amostras 5 e 10 não amplificaram. L – marcador de peso molecular de 50pb.

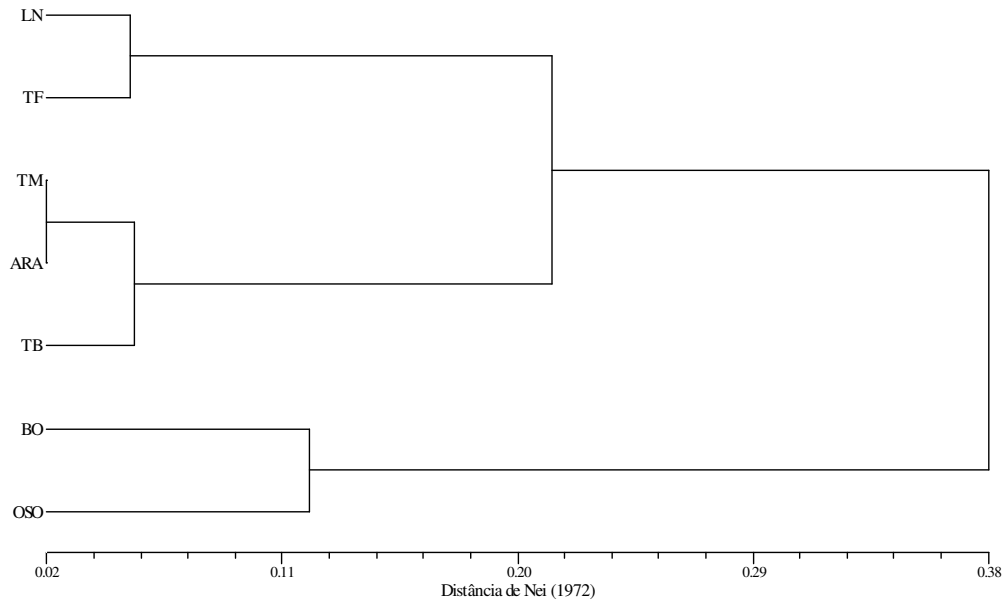


Figura 3. Dendrograma obtido a partir da distância D de Nei (1972) incluindo as sete populações de *Bromelia antiacantha* avaliadas. LN = Lagoa Negra; TF = Trilha do Fenômeno; TM = Taim; ARA = Arambaré; TB = Três Barras; BO = Barra do Ouro; OSO = Osório.

Capítulo 5

***Bromelia antiacantha*: morfologia, fitoquímica e etnobotânica de populações da região Sul**

5.1 Introdução

Caracterização morfológica

O conhecimento da diversidade genética das populações tem papel essencial no sucesso do melhoramento de plantas, e tem sido utilizado com êxito no manejo, conservação e utilização de germoplasma, tanto cultivado quanto nativo. Existem diferentes métodos para estimar a diversidade genética, dentre os quais se encontram os marcadores morfológicos ou fenotípicos (Fufa *et al.*, 2005).

A caracterização da diversidade genética de plantas cultivadas, baseada em caracteres morfológicos, vem sendo utilizada há um longo tempo, pois apresenta vantagens notáveis, como a possibilidade da simples detecção e medição de caracteres relevantes em germoplasmas úteis (López *et al.*, 2008) e também porque permite o acesso ao desempenho do genótipo em condições naturais (Fufa *et al.*, 2005), além de não requererem tecnologias sofisticadas para a mensuração (Newbury & Ford-Lloyd, 1997). No entanto, tal metodologia pode apresentar limitações pois muitas características são controladas por múltiplos alelos e *loci*, tornando difícil relacionar padrões de variabilidade fenotípica com as bases genéticas, além de terem a sua expressão influenciada pelo ambiente (Lombard *et al.*, 2001; Nuel *et al.*, 2001).

A morfologia do fruto de *Bromelia antiacantha* é extremamente variável, o que tem sido relatado por pesquisadores e coletores desta planta (Barros, I.B.I., 2006 – comunicação pessoal), entretanto, nenhuma bibliografia foi encontrada considerando este tipo de análise. Por outro lado, Duarte *et al.*

(2007) avaliaram o peso e o número de frutos de *B. antiacantha* de uma população de Santa Catarina, estimando, desta forma, a produtividade de frutos por planta. Estes resultados são de extrema importância quando o objetivo é a exploração destes recursos genéticos para diferentes fins, como a produção de xarope, por exemplo.

Caracterização fitoquímica

Os pigmentos foliares estão diretamente relacionados a funções fisiológicas nos vegetais. Tais compostos parecem também estar envolvidos em, praticamente, qualquer interação da planta com o ambiente abiótico. Fatores abióticos naturais como irradiação solar, luz UV, seca, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos (Mole & Waterman 1988, Gartlan et al. 1980, Glyphis & Puttick 1988). Os compostos primários, como por exemplo a clorofila e os carotenóides, atuam na absorção e transferência da energia luminosa ao aparato fotossintético, já os metabólitos secundários, como os flavonóides, atuam como sequestradores de radicais livres, têm ação antioxidante, inibem enzimas hidrolíticas e oxidativas, têm ação antiinflamatória (Zhishen et. al., 1999), e podem prevenir ou retardar o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Os flavonóides derivam da rota biossintética do chiquimato, são mais amplamente distribuídos no Reino Vegetal e tiveram um papel fundamental na colonização da terra pelas plantas (Chapman, 1985), o que lhes permite apresentar uma grande gama de ações biológicas.

Dentre os flavonóides, as antocianinas são as mais comuns, sendo responsáveis pela maioria das cores vermelha, rosa, roxa e azul observadas nos vegetais (Taiz & Zeiger, 2006). Elas pertencem ao grupo dos bioflavonóides e auxiliam na proteção das folhas do excesso de luz ou da luz UV, evitando a formação de compostos reativos de oxigênio (Sherwin & Ferrant, 1998). As antocianinas atuam como compostos antifúngicos (Coley & Kusar, 1996), atraindo polinizadores e dispersores de sementes (Canela & Sazima, 2005) e como anti-herbívoros (Schlindwein et. al., 2005).

A produção de pigmentos é influenciada tanto por fatores bióticos quanto abióticos. Em folhas juvenis, é frequente a presença das antocianinas, pois estas auxiliam na proteção do aparato fotossintético em formação (Schlindwein et. al., 2006; Gamon & Surfus, 1999), já que esta fase de desenvolvimento representa um grande investimento de nitrogênio para a planta. Ocorre também em folhas com crescimento limitado por baixas temperaturas ou por situações de estresse (Chalker-Scott, 1999; Pietrini & Massacci, 1998).

A família Bromeliaceae é pouco conhecida do ponto de vista fitoquímico. Os poucos registros disponíveis na literatura, mostram a ocorrência de peptídeos e derivados fenólicos, dentre os quais se destacam os flavonóides, que ocorrem pigmentando folhas vegetativas, hipsófilos em peças florais e nos frutos (Yano, 2003).

Os flavonóides e terpenóides encontrados na família Bromeliaceae são diversificados e mostram-se como bons marcadores sistemáticos em classificação vegetal para o grupo. Os flavonóides de Bromeliaceae apresentam um padrão de oxigenação muito característico no anel A, tendo C6 ligado a um grupo OH livre ou OMe (Yano, 2003), podendo ser utilizados na

indústria farmacêutica e cosmética, tendo em vista suas atividades antioxidantes.

Etnobotânica

O uso de plantas medicinais é uma forma de tratamento terapêutico muito antigo, relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações por sucessivas gerações (Brasil, 2006). No Brasil a utilização de plantas, cultivadas ou não, com fins medicinais é uma prática bem difundida e enriquecida pelas diferenças culturais, herdadas dos índios, europeus e negros, que associadas a grande diversidade vegetal presente no país, geraram uma gama de remédios e tratamentos amplamente difundidos na sabedoria popular (Brandão, 1996). Os compostos primários e secundários sintetizados pelas plantas possuem princípios ativos que em dosagens adequadas podem vir a ser utilizados com fins fitoterápicos. Os compostos secundários se diferenciam dos primários por serem, muitas vezes, específicos de determinados grupos taxonômicos (Martin, 1995).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) no Brasil, 20% da população consomem 63% dos medicamentos disponíveis e o restante os encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas com propriedades medicinais (Araújo Jorge & Scudeller, 2005; Simões *et al.*, 2003). O uso de plantas medicinais, as quais frequentemente são cultivadas em quintais, é uma prática secular baseada no conhecimento popular e transmitida oralmente. Em comunidades carentes a utilização de plantas medicinais é frequente, principalmente pela facilidade na obtenção das plantas, pelo baixo

custo, pela eficiência na prevenção e no tratamento de doenças e pela falta de acesso da população a serviços de saúde (Silva Neto *et al.*, 2005; Barata, 2003).

O estudo etnobotânico consiste na avaliação da interação humana com todos os aspectos do meio ambiente através de levantamentos nas comunidades tradicionais sobre a utilização das plantas (Martin, 1995), gerando informações sobre a origem, a domesticação e a conservação de plantas cultivadas e silvestres, agriculturas tradicionais, uso, percepção e manipulação dos recursos vegetais (Albuquerque, 2005).

Plantas medicinais representam um recurso terapêutico e fonte de recursos econômicos. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias de manejo sustentável voltadas para a utilização destas espécies vegetais é extremamente importante (Reis, 1996). A possibilidade de exploração sustentada de populações naturais de espécies não madeireiras pode favorecer a conservação de porções da Mata Atlântica, e pode gerar renda ao proprietário rural (Pavan-Fruehauf, 2000; Reis & Mariot, 2001; Mariot *et al.*, 2003; Steenbock *et al.*, 2003).

Bromelia antiacantha, pertence à subfamília Bromelioideae, é uma espécie terrícola, estolonífera, de até um metro de altura, com frutos do tipo baga, os quais podem se assemelhar a pequenas bananas (Jorge & Ferro, 1993), sendo conhecida popularmente como bananinha-do-mato. Além disso, apresenta características medicinais, alimentícias, ornamentais e industriais (Reitz, 1983; Barros & Souza, 1995; Haverroth, 1997; Mercier & Yoshida, 1998). Sua utilização na medicina popular é descrita desde a década de 1940, apresentando propriedades anti-helmínticas, antitussígeno e no tratamento de

cálculos renais (Reitz, 1983), além da utilização dos frutos para a confecção de xaropes para o tratamento de doenças do sistema respiratório, função essa mais amplamente utilizada na medicina popular (Caffer, 2005).

Considerando os diferentes usos de *B. antiacantha* relatados, este trabalho teve como objetivo geral avaliar características morfológicas e fitoquímicas desta espécie, bem como avaliar os seus principais usos pela comunidade rural do Rio Grande do Sul. Os objetivos específicos foram: a) avaliar a variabilidade morfológica dos frutos e folhas de *B. antiacantha* do Parque Estadual de Itapuã; b) comparar a produção de flavonóides e antocianinas em folhas e brácteas; c) fazer um levantamento etnobotânico para identificar a utilização de *B. antiacantha* pela comunidade rural.

5.2 Materiais e Métodos

Área de estudo

O presente estudo foi realizado no Parque Estadual de Itapuã, no município de Viamão, RS, Brasil (30°20' a 30°27' S e 50°50' a 51°05' W) a 57Km de Porto Alegre. A temperatura média no local é de 17,5°C e a precipitação anual é de 1.200 mm/ano. Quatro populações foram estudadas: Trilha do Fenômeno (TF), Morro da Grota (MG), Lagoinha (LG) e Lagoa Negra (LN). Também foi coletada uma população na Floresta Nacional (FLONA) de Três Barras (TB), localizada entre o município de Canoinhas e Três Barras em Santa Catarina (26°06'23" S, 50°19'20" W), um ambiente de vegetação típica de Floresta Ombrófila Mista, com temperaturas médias em torno de 16,15°C (Figura 1).

As entrevistas foram realizadas em duas comunidades: em Barra do Ouro, pertencente ao município de Maquiné, e em Santa Vitória do Palmar, nas localidades do Albardão e Quinta. Dois funcionários de dois estabelecimentos comerciais também foram entrevistados: uma banca de produtos coloniais na beira da BR 392, no Km 40, e uma banca de verduras e frutas do Mercado Público de Porto Alegre, onde os frutos são comercializados.

Caracterização morfológica

As coletas foram realizadas nos mês de maio de 2007 e nos meses de maio e julho 2008 em três populações do Parque Estadual de Itapuã: Trilha do Fenômeno, Lagoinha e Lagoa Negra. Foram coletados três frutos por planta, num total de 30 plantas por população. Em 2008, apenas a população da Lagoa Negra formou frutos e a coleta foi realizada em 25 plantas. Em 2008 foi acrescentada na análise a população da FLONA de Três Barras (30 indivíduos), com o objetivo de comparação com os resultados obtidos por Duarte *et al* (2007), os quais realizaram estudo nesta mesma área.

Para a análise da morfologia dos frutos, os seguintes parâmetros foram analisados: número de frutos por planta, forma (redondo, oval, simétrico, assimétrico, banana), cor (amarelo ou alaranjado, podendo ser liso ou rajado), comprimento (cm), largura (cm), relação comprimento/largura, peso (g), concentração de sólidos solúveis (°Brix), maturação (imaturo, parcialmente maduro, maduro) e número de sementes por fruto. Na população da Lagoa Negra, coletada em 2008, foi avaliada a viabilidade das sementes e o comprimento médio das folhas (cm).

Os dados quantitativos foram testados quanto à sua normalidade e submetidos a uma análise de variância, seguida de um teste de Tukey, com o objetivo de testar a diferença entre as médias das populações. Estas análises foram realizadas no “software” SAS (versão 8, Instituto SAS, Cary, Carolina do Norte, USA). Para os dados qualitativos foram calculadas as frequências dos caracteres em cada população.

Caracterização fitoquímica

As coletas foram realizadas em 2008, em quatro populações do Parque Estadual de Itapuã: Trilha do Fenômeno, Morro da Grotta, Lagoinha e Lagoa Negra. Foram coletas duas folhas verdes e duas brácteas vermelhas (aproximadamente 20g de material fresco) de cinco plantas em estágio de início de floração em cada população.

Quantificação de flavonóides: na preparação dos extratos foi empregada uma abordagem fitoquímica clássica para a obtenção dos extratos com riqueza de constituintes polares (Harbone, 1984; Matos, 1997). Discos foliares com aproximadamente 0,5g de folha foram macerados em nitrogênio líquido e foram adicionados 6 ml de etanol PA para extração dos compostos. Foram retirados 1,5 ml dessa solução e adicionados 4,0 ml de H₂O; 0,5 ml de etanol PA; 0,3 ml de NaNO₂ 5%; 0,3 ml de AlCl₃ 10%; 2,0 ml de NaOH 1M e H₂O para completar o volume final de 10ml. A solução dos extratos foi agitada em vortex e as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 510 nm (Cintra 5, GBC) (Zhuang *et al.*, 1992).

Antes de efetuar as leituras, o espectrofotômetro foi calibrado, para isso foram colocados os mesmos reagentes descritos acima e o extrato foi substituído por uma solução de quercetina 1% diluída em etanol PA (flavonóide padrão). A solução de quercetina foi adicionada nos seguintes volumes: 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5 ml, além de uma solução sem quercetina (branco), o volume final foi completado com etanol PA. Estas soluções foram utilizadas para fazer a curva de calibração do espectrofotômetro. A equação obtida foi $y = 0,1285x + 0,0588$, com um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9812$.

Foram obtidas três leituras para cada amostra a 510 nm na quantificação de flavonóides, foi feita uma média dessas leituras e submetidas à equação descrita acima, obtendo-se a quantidade de flavonóides por miligramas.

Quantificação de antocianinas: foram retirados discos foliares de aproximadamente 0,5g e colocados em 5 ml da solução extratora contendo metanol : HCl : H₂O (90 : 1 : 1, vol : vol : vol), mantidos a 4 °C/24h no escuro. As leituras realizadas no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 529 e 650 nm, revelaram os teores deste pigmento, através da equação descrita por Sims & Gamon (2002).

Os dados foram testados quanto à sua normalidade e submetidos a uma análise de variância, seguida de um teste de Tukey, com o objetivo de testar a diferença entre as médias das populações e entre folhas verdes e brácteas vermelhas. Estas análises foram realizadas no programa SAS (versão 8, Instituto SAS, Cary, Carolina do Norte, USA).

Levantamento etnobotânico

O levantamento etnobotânico realizado teve como alvo comunidades rurais do interior do Rio Grande do Sul. Os locais foram selecionados a partir de informações prévias sobre a ocorrência de *B. antiacantha* e através da indicação dos próprios entrevistados, de acordo com o método bola-de-neve descrito por Albuquerque (2004). Foram realizadas 20 entrevistas, duas em estabelecimentos comerciais que vendem os frutos *in natura* e as demais em residências. Foram realizadas entrevistas semi-estruturadas (Cervo & Bervian, 1996). Neste tipo de entrevista, os entrevistados respondem a uma série de perguntas gerais, algumas das quais anteriormente preparadas e outras que surgem naturalmente durante o decorrer da conversação (Martin, 1995). Inicialmente, foi explicado ao entrevistado o objetivo do trabalho e em seguida foram coletados os dados de identificação (nome, idade, profissão e sexo). A seguir, foi realizada uma série de perguntas a respeito de origem, usos, cultivo e manejo da planta (Anexo I).

5.3 Resultados

Caracterização morfológica

As populações de *Bromelia antiacantha* apresentaram grande diversidade fenotípica considerando os caracteres avaliados (Tabela 1), com exceção do estágio de maturação, onde todos os frutos estavam maduros no momento da coleta, evidenciando a falta de diversidade para este caráter nas populações estudadas. A diferença mais marcante observada foi no número de

frutos por planta, comparando a população de Três Barras (média de 229,76) com as do Parque Estadual de Itapuã (entre 25,47 e 37,90 frutos por planta) (Tabela 1) (Figura 2).

Os frutos de Três Barras (SC) são menores que os do Rio Grande do Sul, considerando o peso, comprimento, largura e número de sementes (Tabela 1). A relação comprimento / largura (forma) foi a mais elevada, demonstrando que os frutos têm um tamanho uniforme. Considerando a concentração de sólidos solúveis, somente as plantas da Lagoa Negra diferiram das demais, possuindo um conteúdo maior de açúcar. A população da Trilha do Fenômeno apresentou frutos mais pesados, compridos e com maior número de sementes (Tabela 1).

A viabilidade média das sementes na população da Lagoa Negra foi de 89,6% e o comprimento médio das folhas foi de 125,3cm. A cor predominante foi amarela nas populações do Rio Grande do Sul, com frutos lisos na LN e LG e frutos rajados na TF (Figura 3). A população de TB só apresentou frutos alaranjados, com uma frequência de 0,899 para frutos de cor alaranjada e lisos. Os frutos foram encontrados nos cinco formatos (oval, simétrico, assimétrico, redondo e banana), sendo que os mais frequentes foram ovais nas populações da TF e LN, e simétricos na LG e TB (Figura 4). Apesar da caracterização da cor e formatos dos frutos terem sido realizadas, não houve uma identidade, ou um padrão claro para cada população, sendo que todas elas apresentaram formatos e cores de frutos variáveis, embora em frequências diferentes.

Os dados de morfologia das duas coletas na Lagoa Negra (2007 e 2008) foram comparados (Tabela 2). Houve diferença significativa entre os caracteres avaliados, com exceção do número de frutos por planta e o peso dos frutos.

Caracterização química

A quantidade de flavonóides foi diferente entre as folhas verdes e brácteas vermelhas (Tabela 3). As folhas apresentaram 1,68mg de flavonóides/ml, já as brácteas exibiram 0,43mg de flavonóides/ml ($P < 0,001$). As populações não apresentaram diferença significativa na quantidade de flavonóides quando comparadas folhas verdes entre si ($P = 0,396$) e as brácteas vermelhas entre si ($P = 0,199$, dados não apresentados).

As folhas verdes não apresentaram antocianinas, em compensação as brácteas possuem uma alta quantidade de antocianinas (10,83mg de antocianinas/ml) (Tabela 3). As populações também não apresentaram diferenças na quantidade de antocianinas, considerando-se folhas verdes ($P = 0,0571$) e brácteas vermelhas ($P = 0,452$, dados não apresentados).

Levantamento etnobotânico

De forma geral, uma pessoa por família respondeu as perguntas, porém, houve casos em que mais pessoas presentes na propriedade contribuíram nas respostas. Foram entrevistadas pessoas de níveis sócio-culturais e atividades ocupacionais distintas: agricultor, metalúrgico, professor, pecuarista, motorista, comerciante, doméstica e estudante, com idades entre 20 e 82 anos (Tabela 4).

Bromelia antiacantha é popularmente conhecida pelos entrevistados como bananinha-do-mato, banana-do-mato e gravatá. Das dezoito pessoas

entrevistadas três não conheciam a planta, uma delas conhecia apenas o fruto. Dentre as que conhecem a planta, onze já viram a inflorescência e acham a planta muito bonita durante a sua fase reprodutiva.

A planta foi muito utilizada como cerca viva para o gado, hortas e ao redor das propriedades. Um total de 72% dos entrevistados mencionou a utilização como cerca no passado, sendo que alguns ainda têm vários indivíduos de *B. antiacantha* ao redor de suas cercas atualmente. Devido a sua propagação clonal, as cercas são feitas pela colocação de mudas da planta, uma ao lado da outra, e com o crescimento das mesmas os espaços são fechados.

A porção da planta mais utilizada, segundo os entrevistados, é o fruto, no preparo de xarope para doenças respiratórias. O xarope tem boa aceitação entre a comunidade, sendo que 83% dos entrevistados tinham conhecimento das propriedades fitoterápicas da planta. Uma entrevistada relatou que para confeccionar o xarope costuma escolher os frutos maiores e sadios. Outra pessoa comentou que seus antepassados assavam o fruto na brasa e depois comiam, para curar reumatismo. Os frutos também são apreciados por alguns entrevistados, podendo ser fervido na água com açúcar, assado na brasa ou em rodela com açúcar. Muitos comentaram que já experimentaram o fruto *in natura*, mas não apreciaram devido à sua acidez. Os frutos também são utilizados no preparo de licor, onde são colocados na cachaça e deixados por um período até que estejam aptos para consumo. Pode ser acrescentado um pouco de açúcar, mel ou uma calda preparada com água e açúcar, a qual é adicionada à bebida. O licor é muito apreciado na região.

Quando questionados sobre a variabilidade existente nos frutos de *B. antiacantha*, os entrevistados mencionaram inicialmente que os frutos são amarelos e com formato que lembra uma banana, com alguns mais arredondados. Houve menção de que existem diversos tamanhos de fruto, diferenças quanto à maior ou menor acidez, “doces” e “amargos”. Quanto à infrutescência ou “cacho”, os entrevistados relataram que também há uma grande variação, ou seja, indivíduos apresentando cachos pequenos com poucos frutos e cachos grandes com mais de 50 frutos.

Os entrevistados também foram questionados sobre a presença de polinizadores e de animais da região que se alimentem das folhas e dos frutos. Seis pessoas afirmaram que beija-flores e abelhas visitam as flores. O gado, capivaras, gambás, preás, ovelhas e aves se alimentam dos frutos (Figura 2.C). Também alguns entrevistados responderam que caso deixem os frutos na planta eles normalmente apodrecem, sem que nenhum animal se alimente deles. Além disso, afirmaram que os animais não comem as folhas porque elas têm espinhos.

Os entrevistados afirmaram não arrecadar renda com os frutos da bananinha-do-mato. Afirmaram retirar o cacho no momento da utilização dos frutos e no caso de outras pessoas solicitarem. Em uma banca de produtos coloniais na beira da BR 392, a vendedora informou que eles vendem os cachos por R\$ 5,00 (cinco reais), e que cultivam a bananinha em suas terras, sendo que todo o ano há produção de frutos. O outro estabelecimento entrevistado foi uma Banca do Mercado Público de Porto Alegre. O entrevistado informou que eles compram os cachos de um produtor de Canoas, RS, e o revendem por R\$ 15,00 (quinze reais), ou a unidade (cada fruto) por

R\$ 0,20 (vinte centavos). Segundo os vendedores, os frutos têm boa aceitação, principalmente porque estão maduros entre os meses de maio a julho, período de frio intenso no estado e com alto índice de doenças respiratórias, sendo vendidos para a produção do xarope.

5.4 Discussão

Os resultados obtidos a partir das análises morfológicas revelaram que há uma grande variação na produção e nas características dos frutos de *Bromelia antiacantha*, entretanto não há uma clara identidade considerando cada população. Dentre as populações do Rio Grande do Sul, a Trilha do Fenômeno apresentou frutos mais pesados, compridos e com mais sementes (Tabela 1), mas não apresentou diferença na produção dos mesmos. Os frutos mais doces foram encontrados na Lagoa Negra. A ocorrência de genótipos com maior produção de frutos, que produzam frutos mais pesados, maiores e mais doces pode ser uma boa alternativa quando se busca material que possa ser cultivado visando a comercialização.

Duarte *et al.*, (2007) avaliaram a produção de frutos de *B. antiacantha* na Floresta Nacional de Três Barras, SC, em 2002 e observaram que as plantas em estágio reprodutivo possuem um cacho com uma média de 66 cm de altura, um peso médio de 2,5 Kg, e uma média de 166,2 frutos por cacho. Em 2008, foi observado que uma população na mesma área produziu uma média de 229,76 frutos por planta (Tabela 1). A produção de frutos nesta localidade manteve-se alta e diferente daquelas avaliadas no Rio Grande do Sul. Outros estudos deverão ser realizados com o objetivo de investigar a diferença entre

essas populações considerando a produtividade. Diferenças na composição do solo, fatores climáticos e diferença de nível de ploidia, são fatores que devem ser levados em conta no momento da investigação.

A população da Lagoa Negra apresentou alta diversidade genética (Capítulo 4) e está situada em uma área de restinga, de preservação ambiental e baixa influência antrópica no Parque Estadual de Itapuã, habitat típico da *B. antiacantha*, sendo a única população do Rio Grande do Sul que produziu frutos nas duas florações estudadas. Além disso, apresentou os frutos com maior concentração de açúcar. Diferentes fatores podem ser responsáveis por este fenômeno. Um ponto relevante a ser considerado é que no ano de 2008 a concentração de sólidos solúveis foi de 16,08 (Tabela 2). Neste mesmo ano, poucos indivíduos produziram frutos, indicando alguma alteração biótica ou abiótica, as quais também podem ter influenciado na concentração de açúcar dos frutos. Também, a população da Lagoa Negra, estando num ambiente de restinga, tem menor disponibilidade de água, o que pode ter contribuído para um aumento da concentração de sólidos solúveis. A Trilha do Fenômeno está situada no mesmo parque, mas em um local que no passado sofreu distúrbios ambientais (antiga pedreira) e está em regeneração nos últimos 30 anos, apresentando uma variabilidade genética molecular menor (Capítulo 4). Apesar disso, foi a população que se destacou por possuir frutos mais pesados, compridos e com maior número de sementes em 2007. Em 2008 não foram encontrados indivíduos em estágio reprodutivo. A incongruência entre os dados moleculares e fenotípicos tem sido relatada em diversos trabalhos em inúmeras espécies (Lattoo *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008). Possivelmente, os marcadores moleculares utilizados não tenham acessado a mesma diversidade

observada no fenótipo. O fato de nenhum indivíduo desta população ter produzido frutos em 2008 reflete, provavelmente, algum distúrbio ambiental neste ano. A população de Lagoinha produziu os menores frutos (Tabela 1), seu habitat sofre constantes distúrbios pela presença de duas lagoas que inundam parte da área em estações chuvosas, além da predação por parte das capivaras, que se alimentam das suas folhas. Estes fatores podem estar influenciando a produtividade desta população.

As populações de bananinha do Rio Grande do Sul não apresentaram diferença estatística entre dois anos de frutificação na população da Lagoa Negra (Tabela 2). Em 2008 as populações da Trilha do Fenômeno e de Lagoinha não produziram frutos. Na população de Lagoa Negra houve produção de frutos, mas poucos indivíduos estavam em estágio reprodutivo. A variação no número de indivíduos em estágio reprodutivo ao longo dos anos e entre populações de *B. antiacantha* pode estar relacionada a fatores abióticos sazonais, tais como luz, temperatura e umidade; ou a fatores bióticos, como maior investimento na reprodução clonal em detrimento da reprodução sexual (Honnay & Bossuyt, 2005). Este fenômeno também foi observado nos trabalhos realizados em populações naturais de *Vriesea gigantea* (Paggi *et al.*, 2007), no entanto não existem outros trabalhos em Bromeliaceae abordando tais parâmetros. Devido ao alto recrutamento clonal observado por Duarte *et al.* (2007), esta característica pode estar influenciando a reprodução sexuada nas populações estudadas.

No levantamento etnobotânico, foram obtidas informações sobre a variação presente nos frutos de *B. antiacantha*, a qual foi citada frequentemente nas entrevistas. Apesar de o levantamento etnobotânico ter

sido realizado nos municípios de Maquiné e Santa Vitória do Palmar e a caracterização morfo-química nas populações de Viamão e Três Barras, a variação no número de frutos, no seu formato, tamanho e concentração de açúcar está presente nas duas abordagens, corroborando com os resultados obtidos.

As antocianinas, substâncias com função foto-protetora, não estavam presentes nas folhas, indicando que a espécie deve utilizar outras estratégias para sua proteção. As folhas possuem uma cutícula espessa e uma alta produção de ceras, uma forma de se proteger da incidência luminosa e desidratação (Taiz & Zeiger, 2006). Além disso, as margens das folhas são densamente cobertas por espinhos, característica que auxilia contra a herbivoria. Young (1987) observou um aumento no tamanho dos espinhos de *Acacia depranobium* na presença de mamíferos herbívoros. Os espinhos de *B. antiacantha* possuem uma dureza variável de acordo com o nível de predação e a incidência luminosa no habitat.

As brácteas têm uma alta produção de antocianinas (10,83mg/ml), com coloração vermelha intensa, atrativo para polinizadores (Ogata *et al.*, 2005; Grotewold, 2006). São estruturas mais tenras e delgadas, demonstrando que a espécie aloca gasto energético na produção dessas estruturas para garantir o seu sucesso reprodutivo, sendo uma característica selecionada para garantir a produção de sementes e por consequência a manutenção da espécie. A principal função da pigmentação das peças florais é atrair polinizadores, emitindo sinais marcantes que serão associados à alimentação pelos polinizadores (Menzel, 1985). As relações entre as características florais, o tipo de pigmentação e o comportamento do polinizador têm sido um fator

importante na coevolução das plantas e seus polinizadores correspondentes (Waddington, 2001).

As folhas produziram mais flavonóides que as brácteas (Tabela 3), no entanto, a produção observada nas folhas é considerada baixa (Brigmann *et al.*, 2000), não sendo uma espécie recomendada para o isolamento e utilização desses compostos para fins comerciais. As populações não apresentaram diferenças tanto na produção de flavonóides quanto de antocianinas, não permitindo a recomendação de nenhuma delas como potencial para a utilização destes compostos.

As entrevistas demonstraram que as populações rurais do Rio Grande do Sul utilizam a *B. antiacantha*, na sua maioria, sem o intuito de gerar renda, apesar de o xarope ter uma boa aceitação. A exploração desses recursos deve ser estimulada, visando a geração de renda para as populações rurais. A possibilidade de exploração sustentada de populações naturais de espécies não madeireiras pode favorecer a conservação de relíctos de mata (Pavan-Fruehauf, 2000; Reis & Mariot, 2001; Mariot *et al.*, 2003; Reis & Steenbock, 2004).

Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que há grande diversidade fenotípica em *B. antiacantha*, mas não foi possível estabelecer uma identidade entre as populações do Rio Grande do Sul, sendo importante conservar essa variabilidade para no futuro implementar programas de manejo sustentável, conservação e utilização destes recursos genéticos.

Tabela 1. Comparação da variação fenotípica nos frutos em quatro populações de *Bromelia antiacantha*.

Populações	N	N° frutos/planta	Peso (g)	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Forma (cm)	N° de sementes	CSS (°Brix)
Trilha Fenômeno	87	37,90 ^b	19,94 ^a	4,62 ^a	2,65 ^b	1,74 ^b	27,49 ^a	12,17 ^b
Lagoinha	90	25,47 ^b	12,98 ^c	4,02 ^b	2,35 ^c	1,76 ^b	21,00 ^b	11,63 ^b
Lagoa Negra	164	29,16 ^b	17,30 ^b	3,48 ^c	3,28 ^a	1,19 ^c	22,37 ^b	14,03 ^a
Três Barras	90	229,76 ^a	10,38 ^c	2,91 ^d	1,58 ^d	1,95 ^a	13,73 ^c	12,35 ^b

Tabela 2. Comparação da variação fenotípica nos frutos da população da Lagoa Negra de *Bromelia antiacantha* em dois anos de floração.

Ano	N	N° frutos/planta	Peso (g)	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Forma (cm)	N° de sementes	CSS (°Brix)
2007	90	27,30 ^a	18,17 ^a	4,24 ^a	2,73 ^b	1,56 ^a	19,82 ^b	12,35 ^b
2008	74	31,40 ^a	16,23 ^a	2,55 ^b	3,95 ^a	0,72 ^b	25,43 ^a	16,08 ^a

Tabela 3. Caracterização da produção de flavonóides e antocianinas em folhas e brácteas de *Bromelia antiacantha* no Parque Estadual de Itapuã.

	N	Flavonóides mg/ml	Antocianinas mg/ml
Folhas verdes	20	1,68 ^a	0,0 ^b
Brácteas vermelhas	20	0,43 ^b	10,83 ^a

Tabela 4. Descrição da relação das pessoas entrevistadas no levantamento etnobotânico de *Bromelia antiacantha* em Maquiné, Santa Vitória do Palmar e Porto Alegre.

Entr.	Município	Profissão	Coordenadas Geográficas	Data
1	Maquiné	agricultora	W 50°14'35.2" S 29°34'44.4"	21/06/2008
2	Maquiné	agricultora	W 50°14'40,7" S 29°34'37.1"	21/06/2008
3	Maquiné	metalúrgico	W 50°14'23.6" S 29°34'53.2"	21/06/2008
4	Maquiné	metalúrgico	W 50°14'22.1" S 29°34'53.5"	21/06/2008
5	Maquiné	professora	W 50°14'21.1" S 29°34'40.5"	21/06/2008
6	Maquiné	agricultor	W 50°15'01.5" S 29°34'04.1"	21/06/2008
7	Maquiné	agricultor	W 50°14'58.3" S 29°34'05.6"	21/06/2008
8	Maquiné	agricultor	W 50°14'20.1" S 29°34'50.5"	21/06/2008
9	Maquiné	agricultora	W 50°14'46.0" S 29°32'25.2"	21/06/2008
10	Maquiné	agricultora	W 50°14'45.3" S 29°33'17.4"	21/06/2008
11	Maquiné	comerciante	W 50°14'45.3" S 29°33'17.4"	21/06/2008
12	Santa Vitória do Palmar	doméstica	W 52°34'58.8" S 32°30'12.1"	27/06/2008
13	Santa Vitória do Palmar	motorista	W 52°34'48.9" S 32°29'48.2"	27/06/2008
14	Santa Vitória do Palmar	estudante	W 52°34'43.3" S 32°29'49.1"	27/06/2008
15	Santa Vitória do Palmar	caseiro	W 52°33'56.8" S 32°29'15.1"	27/06/2008
16	Santa Vitória do Palmar	pecuarista	W 52°34'22.8" S 32°30'34.9"	27/06/2008
17	Santa Vitória do Palmar	comerciante	W 52°33'40.6" S 32°30'31.4"	27/06/2008
18	Santa Vitória do Palmar	dona de casa	W 52°33'58.8" S 32°30'55.2"	27/06/2008
19	BR 392, Km 40	vendedor	W 52°32'21.3" S 32°30'12.1"	27/06/2008
20	Porto Alegre	vendedor	W 51°13'40.5" S 30°01'39.1"	05/07/2008

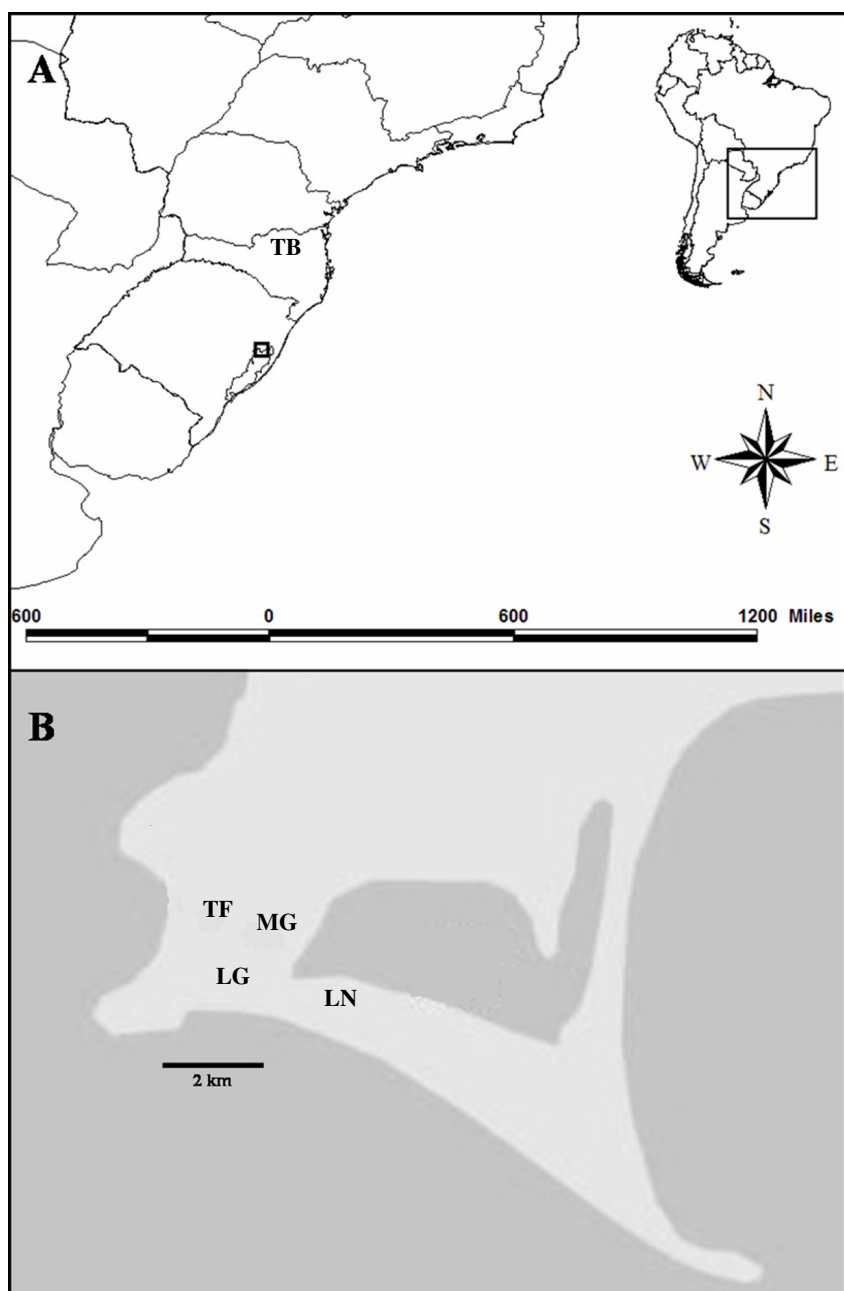


Figura 1. Mapa das populações de *Bromelia antiacantha* amostradas para análises de morfologia e fitoquímica. TB – Três Barras; LN – Lagoa Negra; LG – Lagoinha; MG – Morro da Grota; TF – Trilha do Fenômeno.

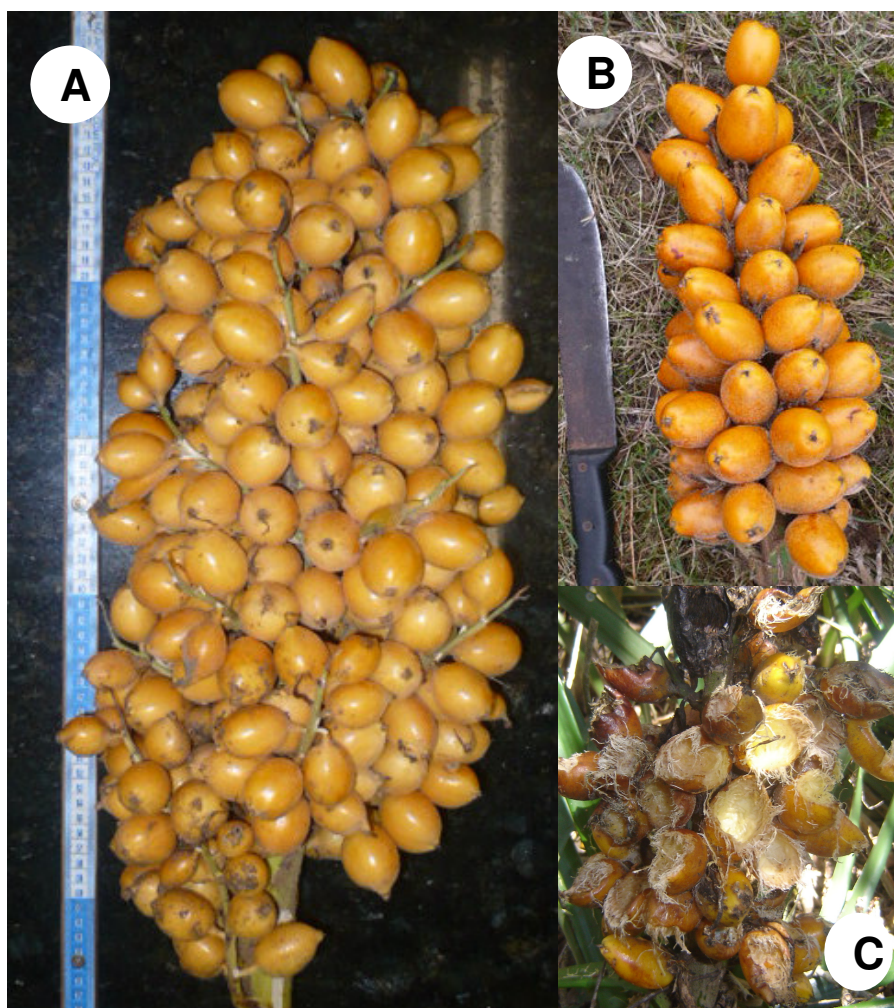


Figura 2. Frutos de *Bromelia antiacantha*. A) Infrutescência coletada na FLONA de Três Barras. B) Infrutescência coletada em Itapuã. C) Predação dos frutos por aves.

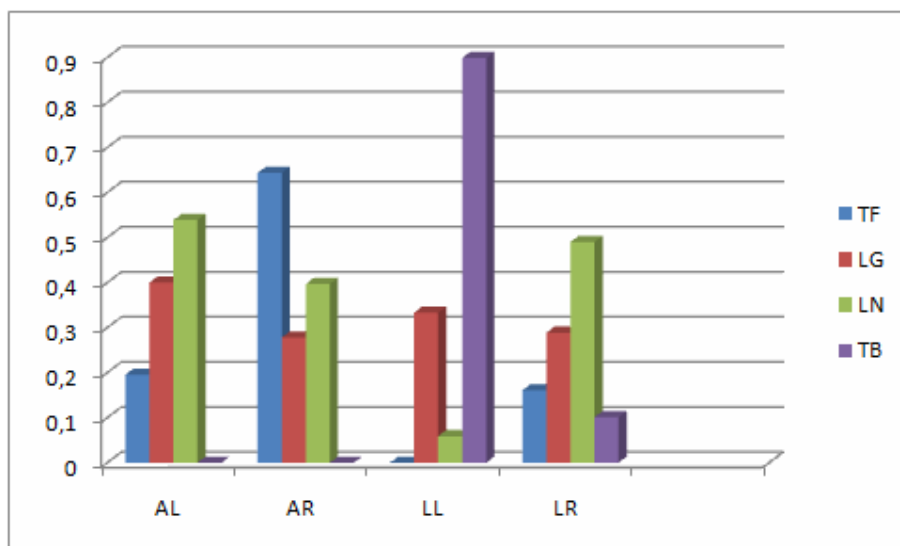


Figura 3. Frequências fenotípicas da cor dos frutos de *Bromelia antiacantha* nas quatro populações amostradas. AL – amarelo liso; AR – amarelo rajado; LL – alaranjado liso; LR – alaranjado rajado; TF – Trilha do Fenômeno; LG – Lagoinha; LN – Lagoa Negra; TB – Três Barras.

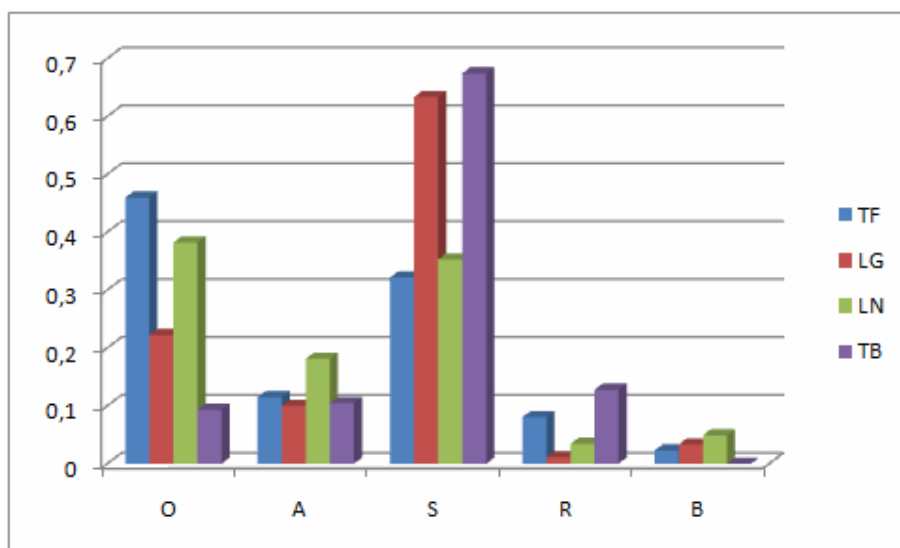


Figura 4. Frequências fenotípicas da forma dos frutos de *Bromelia antiacantha* nas quatro populações amostradas. O – oval; A – assimétrico; S – simétrico; R – redondo; B - banana; TF – Trilha do Fenômeno; LG – Lagoinha; LN – Lagoa Negra; TB – Três Barras.

Capítulo 6

Considerações finais

6. Considerações finais

O presente trabalho está dividido em três capítulos que visam contribuir para os estudos genéticos e biológicos da família Bromeliaceae, principalmente de espécies com potencial econômico que ocorrem no Sul do Brasil. Tais informações são fundamentais para a conservação, manejo e utilização destes recursos genéticos disponíveis na natureza. Este estudo contribuirá no entendimento da diversidade genética, fitoquímica e morfológica, estrutura populacional, além da identificação dos usos de *Bromelia antiacantha* no Rio Grande do Sul.

Por tratar-se de uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, com ampla distribuição e utilização pela comunidade devido as suas propriedades medicinais, *B. antiacantha* tornou-se alvo deste trabalho. É uma espécie de múltiplos usos e com potencial para ser explorada através de estratégias de manejo sustentável e programas de melhoramento que podem aumentar a produção e palatabilidade dos frutos.

Diferentes abordagens foram utilizadas para assegurar uma melhor compreensão da dinâmica populacional e da diversidade genética em *B. antiacantha*. Primeiramente foram desenvolvidos marcadores de microssatélites, os quais foram utilizados juntamente com marcadores descritos para outras duas espécies da família Bromeliaceae. O estudo de caracterização de *loci* de microssatélites corroborou com os resultados obtidos por Gitaí (2004), que identificou que *B. antiacantha* é uma espécie poliplóide, com $2n = ca\ 100$ cromossomos e, pelo padrão das amplificações desses *loci*,

com a presença de até quatro alelos, nos permitiu concluir que provavelmente trate-se de uma planta autopoliplóide.

O estudo de diversidade genética e estruturação populacional demonstraram que *B. antiacantha* possui índices de variabilidade genética semelhantes aos encontrados para outras espécies diplóides da família Bromeliaceae (Barbará *et al.*, 2007b, 2009; Palma-Silva, 2008) e inferiores aos encontrados em espécies autopoliplóides (López-Pujol *et al.*, 2004). A biologia da espécie tem grande influência sobre sua estruturação populacional (Wong & Sun, 1999; Bodanese-Zanettini & Cavalli, 2003). *Bromelia antiacantha* apresentou uma forte estruturação populacional, com alta diferenciação genética entre as populações e baixo fluxo gênico entre elas. A reprodução clonal e o baixo recrutamento de sementes (Duarte *et al.*, 2007) podem estar influenciando na estruturação populacional e na homogeneização das populações.

Os estudos de caracterização morfológica do fruto revelaram que há uma grande variação nas populações de *B. antiacantha*, entretanto não há uma clara identidade considerando cada população. A população de Três Barras, em Santa Catarina destacou-se pela alta produção de frutos, sendo um local interessante para a implementação de um programa de manejo sustentável desse recurso. No Rio Grande do Sul as populações apresentaram uma grande diversidade fenotípica e uma grande variabilidade dentro das populações, o que é uma informação extremamente importante quando o objetivo é a conservação. Os estudos devem ainda ser mais aprofundados para que haja um melhor entendimento da dinâmica das populações e do germoplasma disponível da espécie em questão.

Os estudos fitoquímicos demonstraram que a produção de flavonóides e antocianinas é igual nas populações amostradas. Seria interessante fazer uma análise qualitativa, identificando esses compostos, para verificar se há algum composto exclusivo de *B. antiacantha* ou se a produção é preferencial de algum composto e esse possa futuramente ser utilizado para fins comerciais.

Considerando os aspectos morfológicos e moleculares das populações do Parque Estadual de Itapuã, *B. antiacantha* apresentou uma diversidade molecular relativamente baixa, e as populações são geneticamente próximas, apesar de apresentarem uma grande diversidade fenotípica. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que o ambiente possa estar influenciando na resposta fenotípica de produção dos frutos e / ou a análise molecular não esteja acessando diretamente essa variabilidade.

Relacionando os resultados obtidos a partir da caracterização molecular, morfológica, fitoquímica e etnobotânica, podemos observar que *B. antiacantha* é uma espécie com forte potencial para exploração de seus recursos fitoterápicos. Seus frutos possuem propriedades medicinais e são utilizados apenas na medicina popular (Reitz, 1983). É uma planta de fácil cultivo, com alta viabilidade das sementes e reprodução clonal, além de apresentar diferenças genéticas dentro e entre as populações. É extremamente importante que haja a conservação destas populações, visando não só a conservação do germoplasma em si, mas também a seleção de genótipos superiores para cultivo e / ou melhoramento genético.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

7.1 Referências Bibliográficas

- Albuquerque UP (2004) **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica**. 1^a ed. Recife: Editora Livro Rápido/NEPEEAT, 189p.
- Albuquerque UP (2005) **Introdução à etnobotânica**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Interciência, 80p.
- Araújo-Jorge LH e Scudeller VV (2005) Levantamento etnobotânico de espécies medicinais nas comunidades da colônia central e São João do Tupé (área de relevante interesse ecológico do Tupé), Manaus, AM. **Museu-Listagem de trabalhos**.
- Armour JA, Neumann R, Gobert S e Jeffreys AJ (1994) Isolation of human simple repeats loci by hybridization selection. **Human Molecular Genetics**, 3:599-565.
- Barata G (2003) Medicina popular obtém reconhecimento científico. **Ciência e Cultura**, 55(1):12-12.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF e Lexer C (2007)a Cross-species transfer of nuclear microsatellites markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, 16:3759-3767.
- Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo J e Lexer C (2007)b Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). **Molecular Ecology** 16:1981-1992.
- Barbará T, Martinelli G, Palma-Silva C, Fay MF, Mayo S e Lexer C (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, 103:65-77.
- Barros IPI, Souza PL (1995) Coleta de germoplasma de *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) no Rio Grande do Sul. In: **Simpósio Nacional de Recursos Genéticos Vegetais**, Campinas Anais do congresso, p.17.

- Bennett BC, Baker MA e Gómez P (2001) Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador. **Advances in Economic Botany** 14:1-299.
- Benzing DH (2000) **Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation**. Cambridge University Press, Cambridge, 689 p.
- Bered F, Kaltchuk-Santos E, Palma-Silva C e Paggi GM (2008) Bromélias – A beleza exótica do Novo Mundo. In: Barbieri RL, Stumpf ERT (eds) **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília – DF, pp. 235-251.
- Bever JD e Felber F (1992) The theoretical population genetics of autopolyploidy. In: Antonovics J, Futuyma D (eds) **Oxford surveys in evolutionary biology**. Oxford: Oxford University Press, 185-217.
- Billote N, Risterucci A-M e Baurens F-C (1999) Microsatelliteenriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** 54:277–288.
- Bodanese-Zanettini MH e Cavalli SS (2003) Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: Freitas LB e Bered F (eds) **Genética e Evolução Vegetal**. 1ª ed. Editora UFRGS. Porto Alegre, pp 177-188.
- Bon MC, Hurard C, Gaskin, J e Risterucci AM (2005) Polymorphic microsatellites markers in polyploid *Lepidium draba* L, ssp. *draba* (Brassicaceae) and cross-species amplification in closely related taxa. **Molecular Ecology Notes**, 5:68-70.
- Boneh L, Kuperus P e Van Tienderen PH (2003) Microsatellites in bromeliads *Tillandsia faciculata* and *Guzmania monostachya*. **Molecular Ecology Notes** 3:302-303.
- Brandão MGL (1996) Plantas medicinais. In: Guerra CB, Barbosa FAR (eds) **Programa de Educação Ambiental na Bacia do Rio Piracicaba**. Belo Horizonte: Editora da UFMG, pp. 173-193.
- Brasil (2006) **Ministério da saúde. O SUS de A a Z: garantindo saúde nos municípios**. 2ª edição. Brasília: Editora MS, 384p.

- Bringmann G, Ochse M, Zotz G, Peters K, Peters EM, Brun R e Schlauer J (2000) 6-Hydroxyluteolin-7-O-(1''- α -rhamnoside) from *Vriesea sanguinolenta* Cong. and Marchal (Bromeliaceae). **Phytochemistry**, 53:965-969.
- Brown AHD e Young AG (2000) Genetic diversity in tetraploid populations of the endangered daisy *Rutidosis leptorrhynchoides* and implications for its conservation. **Heredity**, 85:122-129.
- Caffer MM (2005) **Caracterização do conhecimento de populações locais sob a diversidade de RGV em remanescentes de Floresta Ombrófila Mista**. 104p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Canela MBF e Sazima M (2003) *Aechmea pectinata*: a hummingbird-dependent bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in southeastern Brazil. **Annals of Botany** 92:731-737.
- Canela MBF e Sazima M (2005) The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in southeastern Brazil: ornithophilous versus melittophilous features. **Plant Biology** 7:1-6.
- Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI e Oliveira GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Epinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. **Biodiversity and Conservation** 15:4357-4373.
- Cervo AL e Bervian PA (1996) **Metodologia científica**. 4ª Ed. São Paulo: Makron Books, 209p.
- Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. **Photochemistry and Photobiology**, 70:1-10.
- Chapman DJ (1985) Geological factors and biochemical aspects of the origin of land plants. In: Tiffney PH (Ed.) **Geological factors and evolution of land plants**. New York: Vail/Ballou, 259p.

- Cifarelli RA, Gallitelli M e Cellini F (1995) Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. **Nucleic Acids Research**, 23:3802-3803.
- Coffani-Nunes JV (2002) Bromélias. In: Simões LL e Lino CF (Org.) **Sustentável Mata Atlântica – A exploração de recursos vegetais**. Editora Senac, São Paulo, pp 119-132.
- Cogliatti-Carvalho L e Rocha CFD (2001) Spatial distribution and preferential substrate of *Neoregelia johannis* (Carrière) L.B. Smith (Bromeliaceae) in a disturbed area of Atlantic Rainforest of Ilha Grande, RJ, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 24(4):389-394.
- Coley PD e Kusar TA (1996) Anti-herbivore defense of young tropical leaves: physiological constraints and ecological tradeoffs. In: Mulkey RL, Chazdon RL, Smith AP (eds) **Tropical Forest Plant Ecophysiology**. New York: Chapman & Hall, pp. 305-335.
- Cotias-de-Oliveira ALP, Assis JGA, Bellintani MC, Andrade JCS e Guedes MLS (2000) Chromosome numbers in Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**. 23:173-177.
- Doyle JJ e Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13-15.
- Duarte AS, Vieira da Silva C, Puchalski A, Mantovani M, Silva JZ e Reis MS (2007) Estrutura demográfica e produção de frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 9:106-112, n.3.
- Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C e Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellites sequences in plants. **Biotechniques**, 20:758.
- Fischer M, Husi R, Prati D, Peintinger M, Kleunen MV e Schmid B (2000) RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal

- plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany** 87:1128-1137.
- Fufa H, Baenziger PS, Beecher BS, Dweikat I, Graybosch RA e Eskridge KM (2005) Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. **Euphytica** 145:133-146.
- Gamon JA e Surfus JS (1999) Assessing leaf pigment content and activity with reflectometer. **New Phytologist**, 143:105-117.
- Gartland JS, McKey DB, Waterman PG, Mbi CN e Struhsaker TT (1980) A comparative study of the phytochemistry of two African rain forest. **Biochemistry Systematic Ecology**, 8:401-422.
- Gentry AH (1974) Flowering phenology and diversity in tropical Bionniaceae. **Biotropica** 6:64-68.
- Gitaí JSF (2004) **Contribuição de Características Citogenéticas e Moleculares à Sistemática de Bromeliaceae**. Tese de doutorado, Universidade federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Gitaí J, Horres R e Benko-Iseppon AM (2005) Chromosomal features and evolution Bromeliaceae. **Plant Systematics and Evolution** 253:65-80.
- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE e Sytsma KJ (2004) Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south American-african disjunctions in rapateaceae and Bromeliaceae based on ndhf data. **International Journal of Plant Science** 165 (4 Suppl.):S35-S54.
- Glyphis JP e Puttick GM (1988) Phenolics in some Southern African mediterranean shrublands plants. **Phytochemistry**, 27:743-751.
- González-Astorga J, Cruz-Angón A, Flores-Palacios A e Vovides AP (2004) Diversity and genetic structure of the mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. Ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). **Annals of Botany** 94:545-551.

- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annual Review Plant Biology**, 57:761-780.
- Hamrick JL e Loveless MD (1986) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: Estrada A and Fleming TH (eds.) **Frugivores and Seed Dispersal**. Junk Publ., The Hague, pp. 211-223.
- Handa T (1998) Utilization of molecular markers for ornamental plants. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science** 67:1197-1199.
- Harbone JB (1984) **Phytochemical Methods – A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. 2nd Edition, Chapman & Hall, London, 288p.
- Haverroth M (1997) **Kaingang: um estudo etnobotânico. O uso e classificação das plantas na área Indígena Xaçepó**. 192p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Honnay O, Bossuyt B (2005) Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? **Oikos**, 108:427-432.
- Izquierdo LY e Piñero D (1998) Allozyme divergence among four species of *Podaechmea* s. L. and the status of *Ursulaea* (*Bromeliaceae*, *Bromelioideae*). **Plant Systematics and Evolution** 213:207-215.
- Izquierdo LY e Piñero D (2000) High genetic in the only know population of *Aechmea tuitensis* (*Bromeliaceae*). **Australian Journal of Botany** 48:645-650.
- Janzen DH (1980) **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 80p.
- Jarne P e Lagoda P (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. **Tree** 11:424-429, n.10.

- Jorge LIF e Ferro VO (1993) Reconhecimento da espécie *Bromelia antiacantha* Bertol. Características botânicas e fitoquímicas. **Revista Farmácia e Bioquímica**. Universidade de São Paulo, vol. 29, nº 2, p. 69-72, jul./dez.
- Karagyozev L, Kalcheva ID e Chapman VM (1993) Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. **Nucleic Acids Research**, 21:3911-3912.
- Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA e Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **BioTechniques** 16:656–660.
- Lattoo SK, Dhar RS, Khan S, Bamotra S, Bhan MK, Dhar AK e Gupta KK (2008) Comparative analysis of genetic diversity using molecular and morphometric markers in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. **Genetic Resource Crop Evolution**, 55:33-43.
- Levin DA (1983) Polyploid and novelty in flowering plants. **American Naturalist**, 122:1-25.
- Lombard V, Dubreuil P, Dillman C e Baril CP (2001) Genetic distance estimators based on molecular data for plant registration and protection: a review. **Acta Horticulture**, 546:55-63.
- López PA, Widrechner MP, Simon PW, Rai S, Boylston TD, Isbell TA, Bailey TB, Gardner CA e Wilson LA (2008) Assessing phenotypic, biochemical, and molecular diversity in coriander (*Coriandrum sativum* L.) germplasm. **Genetic Resource Crop Evolution**, 55:247-275.
- López-Pujol J, Bosch M, Simon J e Blanché C (2004) Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscossi* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, 93:323-332.
- López-Pujol J, Orellana MR, Bosch M, Simon J e Blanché C (2007) Low genetic diversity and allozymic evidence for autopolyploidy in the tetraploid

- Pyrenean endemic larkspur *Delphinium montanum* (Ranunculaceae). **Botanical journal of the Linnean Society**, 155:211-222.
- Luther HE (2004) **An alphabetical list of bromeliad binomials**, 9ª edição. Orlando, FL: Bromeliad Society International.
- Mahy G, Bruederle LP, Connors B, Van Hofwegen M e Vorsa N (2000) Allozyme evidence for genetic autopolyploidy and high genetic diversity in tetraploid cranberry, *Vaccinium oxycoccos* (Ericaceae). **American Journal Of Botany**, 87:1882-1889.
- Marchant CJ (1967) Chromosome evolution in the Bromeliaceae. **Kew Bull.** 21:161-168.
- Mariot A, Mantovani A e Reis MS (2003) Uso e conservação de *Piper cemuum* Vell. (Piperaceae) na Mata Atlântica: Fenologia reprodutiva e dispersão de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 5:1-10, n.3.
- Martin GJ (1995) Etnobotânica: “pueblos e plantas” manual de conservación. 1 ed. Montevideo: Nordan-Comunidad, 240p.
- Martinelli G (1997) Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica da Macaé de Cima. In Lima HC Guedes-Bruni RR (eds) **Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica**. Editora: JP/JBRJ, Rio de Janeiro pp. 213-250.
- Matos FJA (1997) **Introdução à Fitoquímica Experimental**. UFC Edições, Fortaleza, 141p.
- McDonald' DB e Potts WK (1997) DNA Microsatellites as Genetic Markers at Several Scales. **Avian molecular evolution and systematics**. D.P. Mindell ed. Academic Press, San Diego, pp. 29-50.
- Menzel R (1985) Learning in honeybees in na ecological and behavioral context. In: Hölldobler B, Lindauer M. **Experimental Behavioral Ecology**, Stuttgart: Fisher, pp. 55-74.

- Mercier H e Yoshida MK (1998) Bromelian activity leaf tissue oh *Bromelia antiacantha*. **Journal of the Bromeliad Society**, 48: 6-10.
- Mole S e Waterman PG (1988) Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. **Journal of Chemical Ecology**, 14(1):23-34.
- Morgante M e Oliveri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal** 3:175-182.
- Morin PA, Mahboubi P, Wedel S e Rogers J (1998) Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: allele size is conserved, but allele number is not. **Genomics**, 53: 12-20.
- Murawski AD e Hamrick JL (1990) Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. **American Journal of Botany** 77:1201-1208.
- Nakamura S (1972) **Alguns estudos sobre obtenção de enzimas proteolíticas em *Bromelia antiacantha* Bertoloni**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, 33p.
- Nei M (1972) Genetic distances between populations. **American Naturalist**, 106:283-292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, 70:3321-3323.
- NewBury HJ e Ford-Lloyd BV (1997) Estimation of genetic diversity. In: Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG (eds) **Plant genetic conservation. The in situ approach**. Chapman & Hall, London.
- Noreno N, Malleville J, Huarte M e Feingold S (2002) Cost efficient potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar identification by microsatellite amplification. **Potato Research**, 45:131-138.
- Nuel G, Baril C e Robin S (2001) Varietal distinctness assisted by molecular markers: a methodological approach. **Acta Horticulture**, 546:65-71.

- Ogata J, Kanno Y, Itoh Y, Tsugawa H e Suzuki M (2005) Anthocyanin biosynthesis in roses. **Plant Biochemistry**, 435:757-758.
- Ota T (1993) DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis. **Institute of Molecular Evolutionary Genetics**, Pennsylvania State University.
- Otto Sp e Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, 34:401-437.
- Paggi GM (2006) **Biologia reprodutiva e estudo da fertilidade de *Vriesea gigantea* (Gaud., Bromeliaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Silveira LCT, Kaltchuk-Santos E, Bodanese-Zanettini MH e Bered F (2007) Fertility of *Vriesea gigantea* Graud, (Bromeliaceae), in Southern Brazil. **Amerian Journal of Botany**, 94(4):683-689.
- Paggi GM, Palma-Silva C, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C e Bered F (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species. **Molecular Ecology Research**, 8:980-982.
- Palma-Silva C (2008) **Genética, Filogeografia e Fertilidade de populações de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae)**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes A, Bered F e Bodanese-Zanettini MH (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads species. **Molecular Ecology Notes** 7:265-267.
- Palma-Silva C, Santos DG, Kaltchuk-Santos E e Bodanese-Zanettini MH (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species

- Vriesea and Aechmea genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Botany** 91:804-807.
- Pavan-Fruehauf S (2000) **Plantas medicinais na mata Atlântica: manejo sustentável e amostragem**. São Paulo: Annablume/FAPESP, 253p.
- Pietrini F e Massacci A (1998) Leaf anthocyanin content change in *Zea mays* L. grown at low temperature: Significance of relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation. **Photosynthesis Research**, 58:213-219.
- Porembski S e Barthlott W (1999) *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. **Harvard Papers in Botany** 4:175–184.
- Reis MS (1996) Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: Di Stasi LC (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, pp.199-215.
- Reis MS e Mariot A (2001) Diversidade natural e aspectos agrônômico de plantas medicinais. In: Simões CMO et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. Da UFSC, pp.41-62.
- Reis MS e Steenbock W (2004) Manejo de populações naturais de Espinheira Santa. In: Reis MS e Silva SR (eds) **Plantas Medicinais e Aromáticas: Espinheira Santa**. Brasília. v.1, p.145-162.
- Reitz R (1983) Bromeliaceas e a malária – Bromélias endêmicas. In: **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 856pp.
- Ronfort J, Jenczewske E, Bataillon T e Rousset F (1998) Analysis of population structure in autopolyploid species. **Genetics**, 150:921-930.
- Rohlf FJ (2000) **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter Software.

- Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Lavi U e Cregan PB (1994) The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics** 90:43-48.
- Ruas PM, Ruas CF, Fairbanks DJ, Andersen WR e Cabral JRS (1995) Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Brazilian Journal of Genetics** 18:413-416.
- Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li SH, Margolis RL, Ross AC e Ferguson-Smith MA (1995) Microsatellites evolution – evidence for directionality and variation in rate between species. **Nature Genetics**, 10:337-343.
- Saghai-Marouf MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q e Allard R (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 91:5466-5470.
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J e Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcainia geyskii* L. B. Smith (Bromaliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. **Molecular Ecology Notes** 3:221-223.
- Sazima M, Buzato S e Sazima I (2000) Polinização por beija-flores em *Nidularium* e gêneros relacionados. In Leme EC **Bromélias da Mata Atlântica – *Nidularium* Hamburg**. Donnelley gráfica Editoda Ltda, Rio de Janeiro pp.190-195.
- Schindwein CCD, Fett-Neto AG e Dillenburg LR (2005) Chemical and mechanical during leaf expansion of four woody species of a dry “restinga” woodland. **Plant Biology**, 8:1-9.
- Sgorbati S, Labra M, Gruni E, Barcaccia G, Galasso G, Boni U, Mucciarelli M, Citterio S, Iramátegui AB, Gonzáles LV e Scannerini S (2004) A Survey of

- Genetic Diversity and Reproductive Biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the Endangered Queen of the Andes. **Plant Biology** 6:1-9.
- Sharma AK e Gosh I (1973) Cytotaxonomy of the family Bromeliaceae. *Cytologia* 36:237-247.
- Sherwin HW e Ferrant JM (1998) Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. **Plant Growth Regulation**, 24:203-210.
- Silva-Neto PA, Alvino FO e Rayol BP (2005) Levantamento etnobotânico preliminar de plantas empregadas como medicinais na comunidade de um bairro em Belém-PA. Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). **Museu-listagem de trabalhos**.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA e Petrovick PR (2003) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFSC. 1102p.
- Sims DA e Gamon JA (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and development stages. **Remote Sensing of Environment**, 81:337-354.
- Smith LB e Downs RJ (1979) Bromelioideae (Bromeliaceae). In **Flora neotropica 14, Part 3**. The New York Botanical Garden, Hafner Press, New York, pp. 1658-1660.
- Soltis DE e Rieseberg LH (1986) Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis. **American Journal of Botany**, 73:310-318.
- Soltis DE, Gilmartin J, Rieseberg L e Gardner S (1987) Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany** 74:531-537.

- Soltis DE e Soltis PS (1989) Genetic consequence of autopolyploidy in *Tolmiea* (Saxifragaceae). **Evolution**, 43:586-594.
- Soltis DE e Soltis PS (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 12:243-273.
- Soltis PS e Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. National Academy of Science Colloquium **Variation and Evolution in Plants and Microorganisms: Toward a New Synthesis 50 Years after Stebbins**. January 2000, Irvine, California, pp. 27-29.
- Stebbins GL (1947) Types of polyploids: their classification and significance. **Advances in Genetics**, 1:403-429.
- Stebbins GL (1980) Polyplois in plants: unresolved problems and prospects. In: Lewis WH, ed. **Polyploidy**. New York: Plenum Press, pp. 495-520.
- Steenbock W, Radomski MI, Soares AO, Puchalski A, Gomes GS e Reis MS (2003) Avaliação de características fenotípicas para a determinação do rendimento foliar em espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Martius). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 6:71-76, n.1.
- Stiles FG (1981) Geographical aspects of bird flower coevolution with particular reference to Central America. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 68:323-351.
- Taiz L, Zeiger E (2006) **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 820p.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17:6463-6471.
- Thomas MR e Scott WS (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites. **Theoretical and Applied Genetics** 86:985-990.

- Thrall PH e Young A (2000) AUTOTET: a program for analysis of autotetraploid genotypic data. **The Journal of Heredity**, 91(4):348-349.
- Truong C, Palmé E, Felber F e Naciri-Graven Y (2005) Isolation and characterization of microsatellites markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa*. **Molecular Ecology Notes**, 5:96-98.
- Yang GP, Saghai-Maroo MA, Xu CG, Zhang Q e Biyashev RM (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molecular and General Genetics** 245:187-194.
- Yano M (2003) **Estudos químico e farmacológico de Bromeliaceae brasileiras**. Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.
- Young TP (1987) Increased thorn length in *Acacia depranlobium* – an induced response to browsing. **Oecologia**, 71:436-438.
- Waddington KD (2001) Subjective evolution and choices behavior by nectar and pollen collections bees. In: Chittka L, Thomson JD. **Cognitive Ecology of Pollination: Animal Behavior and Evolution**. Cambridge: UK, pp. 41-60.
- Wang ZJ, Weber L, Zhong Z e Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 88:1-6.
- Wong KC e Sun M (1999) Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, 86(10):1406-1413.
- Wright S (1951) The genetic structure of populations. **Annals of Eurogenics**, 15:323-354.
- Wu K, Jones R, Danneberger L e Scolnik PA (1994) Detection of microsatellites polymorphisms without cloning. **Nucleic Acids Research**, 22:325-3258.

- Zane L, Bargelloni L e Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, 11:1-16.
- Zhishen J, Mengcheng T e Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 64:555-559.
- Zhuang Xp, Lu YY e Yang GS (1992) Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. **Chinese Herbal Medicine**, 23:122-124.
- Zizka G, Horres R, Nelson EC e Weising K (1999) Revision of the genus *Fascicularia* Mez (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 129:315-332.

Anexos

Anexo I

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Entrevista semi-estruturada para levantamento etnobotânico de *B. antiacantha*
Camila Martini Zanella

Dados do entrevistado:

Data: ___/___/___

Município:

Localidade:

Propriedade:

Ponto de GPS:

Contato:

Entrevistado:

Sexo:

Idade:

Profissão:

Questões:

- 1) Qual o tamanho da população de bananinha na sua propriedade?
- 2) Quanto tempo a população está no local?
- 3) Qual a origem dessas plantas?
- 4) Como é a área em que ela está?
- 5) Como conheceu a bananinha?
- 6) Conhece a planta por outros nomes?
- 7) Faz algum uso da planta? Qual?
- 8) Qual o principal uso da planta?
- 9) Utiliza o fruto para alimentação?
- 10) Artesanato?
- 11) Medicinal?

- 12) Como aprendeu a fazer o xarope?
- 13) Qual a aceitação do xarope entre seus familiares?
- 14) Outro tipo de utilização, mesmo que no passado?
- 15) Possui alguma renda através da bananinha? Como?
- 16) Acha a planta bonita? Ou atribui outra utilidade para ela?
- 17) Já plantou essa bromélia?
- 18) Como fez?
- 19) É comum ter frutos nesta população?
- 20) Já viste a inflorescência? O que achou?
- 21) Que animais visitam a planta durante a floração?
- 22) E o cacho de frutos, como eles são? Quantos frutos possuem em média?
- 23) Percebe alguma diferença entre as plantas ou frutos de bananinha?
- 24) Qual? (forma, cor, tamanho, nº de frutos por planta, acidez)
- 25) Conhece alguma doença que ataque a bananinha?
- 26) Animais da região se alimentam dos frutos?
- 27) Quando os cachos de frutos amadurecem o que vocês fazem com eles?
Todos são retirados das plantas?
- 28) Existe alguma tradição na região relacionada com a bananinha? Qual?
- 29) A população de bananinha na região está aumentando, diminuindo ou estável?
- 30) Faz alguma coisa para conservar as plantas?
- 31) E outras espécies de bromélias estão presentes na região? Quais?
- 32) São apreciadas pela sua família?