



Título do Projeto: Filogeografia, diversidade e estrutura genética de *Vriesea oligantha* (Bromeliaceae) endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço

Orientadora: Profa. Dra. Clarisse Palma da Silva – Universidade Estadual de Campinas

Aluna: Tami da Costa Cacossi – Graduada do curso de Ciências Biológicas da UNICAMP

Colaborador: Ms. Marcos V. Dantas de Queiroz – doutorando PPG Biologia Vegetal, UNESP

Programa de Iniciação Científica e Tecnológica da PRP/UNICAMP, quota 2019/2020

CONTEXTO

A região Neotropical é notavelmente reconhecida por sua alta diversidade biológica (Antonelli et al. 2018). Neste contexto, estudos filogeográficos têm se tornado cada vez mais frequentes, fornecendo valiosas informações sobre os processos históricos que subsidiaram a rica biodiversidade nesta região (Turchetto-Zolet et al. 2013; Leal et al. 2016) principalmente em áreas prioritárias para a conservação e com alto grau de endemismo tais quais a Cadeia do Espinhaço, localizada a leste do Brasil, entre o centro-sul do estado de Minas Gerais (21° 10' S) até o centro-norte da Bahia (10° 10' S) (Chaves et al. 2014). Por apresentarem um padrão naturalmente fragmentado, campos rupestres do Espinhaço contribuem para investigações acerca de como ambientes heterogêneos promoveram e ainda promovem a diferenciação genética, temporal e espacial de espécies e populações (Giulietti et al. 1997; Knowles & Richards 2005; Conceição et al. 2007; Wang & Bradburd 2014).

A família Bromeliaceae é reconhecida como um excelente exemplo de radiação adaptativa no Neotrópico (Benzing 2000; Givnish et al. 2014). No Espinhaço, diversos levantamentos florísticos (Rapini et al. 2008) demonstraram que a família Bromeliaceae possui um elevado número de espécies endêmicas (49,5%), sendo os campos rupestres do Espinhaço considerados como um dos centros de diversificação para a família (Versieux et al. 2008, 2010). *Vriesea*

oligantha está entre as bromélias endêmicas desta região e foi utilizada neste projeto como modelo para o estudo dos processos evolutivos de espécies de plantas neotropicais ocorrentes em ambientes naturalmente fragmentados.

OBJETIVOS DO PROJETO

- 1) Avaliar a estrutura genética e o grau de isolamento entre populações disjuntas de *Vriesea oligantha* na Cadeia do Espinhaço.
- 2) Investigar como a distribuição geográfica influencia a estrutura genética das populações, e os mecanismos envolvidos na diversificação do grupo, utilizando uma abordagem filogeográfica;
- 3) Comparar nossos resultados com trabalhos anteriores realizados no Espinhaço, avaliando se há similaridades e/ou divergências contrastantes nas histórias de vida dos organismos desta região.

DESCRIÇÃO

A partir do DNA genômico extraído de 12 populações de *Vriesea oligantha* (\cong 20 indivíduos por população - totalizando 229 indivíduos), 9 lócus de microssatélites nucleares previamente desenvolvidos para outras espécies de Bromeliaceae foram amplificados e genotipados.

Foram avaliados os níveis de diversidade genética das populações e dos locos de microssatélites através do cálculo: número de alelos, riqueza alélica, variância do tamanho dos

alelos, heterozigidade observada e heterozigidade esperada, calculados em FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 1995). O programa MSANALYSER v.4.05 (Dieringer & Schlötterer, 2003) foi utilizado para testar os princípios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como para calcular a estatística F (F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} ; Wright, 1951). A estrutura genômica foi estimada por meio da análise de variância molecular (AMOVA) em ARLEQUIN versão 3.5 (Excoffier et al., 2010) e pelo número de agrupamentos genéticos (K) determinados pela análise Bayesiana em STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al. 2000).

Dois modelos de migração – panmítico, no qual todas as populações migram entre si, e adjacente, no qual a migração é possível apenas para populações imediatamente próximas – foram testados programa MIGRATE (Beerli & Felsenstein, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcadores nucleares de microssatélites

Todos os 9 locos foram polimórficos para *V. oligantha*, com um número médio de 18 alelos variando entre 4 e alelos por loco. A heterozigidade observada e esperada para os locos, levando em conta todas as populações, variaram de 0,175 a 0,422 e 0,200 a 0,686, respectivamente. Todos os locos desviaram significativamente do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), apresentando déficit de heterozigotos. Esse déficit pode ser decorrente da endogamia, efeito Wahlund e/ou da ocorrência de alelos nulos (Soares et al. 2018).

Diversidade genética em *V. oligantha*

A riqueza alélica (AR) variou entre 1,714 e 3,124, e a variância no tamanho do alelo entre 2,975 e 22,585 para cada população. Os valores de heterozigidade observada e esperada por população variaram, respectivamente, de 0,034 a 0,550 e 0,266 a 0,627. O coeficiente de endogamia (F_{IS}), com exceção de uma população, foi alto e significativo para todas as populações ($F_{IS}=0.435$; s.d = 0.035; $P<0,001$)

de acordo com o esperado para espécies auto compatíveis como observado para muitas espécies do gênero *Vriesea*, (Paggi et al. 2007; Lavor et al. 2014; Neri et al. 2017). O coeficiente de endogamia total (F_{IT}) também foi significativo ($F_{IT}=0.664$; s.d = 0.021; $P<0,001$), indicando que o sistema de reprodução da espécie não é aleatório, assim como ocorre em outras espécies de *Vriesea*, por exemplo em *Vriesea scalaris* (Neri et al. 2017), cujo sistema reprodutivo predominante é o de autofecundação.

Com exceção de dois locos, todos foram fixados em um único alelo em uma ou mais populações. A fixação de alelos pode ser explicada pelo efeito da deriva genética (Hartl, 2008). Foram encontradas evidências de sinal de Bottleneck genético para três populações que apresentaram um significativo excesso de heterozigidade esperada pelo EHW (HE) comparada à esperada pelo equilíbrio entre mutação e deriva (HEQ).

Padrões de divergência populacional e demografia

A AMOVA hierárquica calculada sem base na distância entre os alelos de microssatélites demonstrou que o valor de diferenciação genética entre os agrupamentos foi alto e significativo, com $F_{CT} = 0.20256$ ($P<0.01$), assim como os valores de diferenciação genética entre populações dentro de cada grupo $F_{SC}=0.32305$ ($P<0.0001$), e entre todas as populações $F_{ST}=0.46017$ ($P<0.0001$).

A análise Bayesiana através do programa STRUCTURE identificou $K=11$ (Figura 1), valor que melhor representa os possíveis agrupamentos genéticos de acordo com a metodologia ΔK proposta por Evanno et al. (2005). Os agrupamentos genéticos e as proporções Bayesianas de combinações para cada indivíduo estão evidenciadas na Figura 2.

De maneira geral, foi encontrado alto nível de estrutura populacional em *V. oligantha*, o que indica a ocorrência de baixo fluxo gênico e condiz com os resultados encontrados para outras espécies de Bromeliaceae que ocorrem

em ambientes naturalmente fragmentados: *Pitcairnia albiflos* (Domingues et al. 2011); *Pitcairnia geyskesii* (Boisselier-Dubayle et al. 2010) e *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* e *A. Imperialis* (Barbará et al. 2009). O modelo de migração mais verossímil dentre os testados foi o adjacente, de acordo com o modelo de migração “Stepping-stone” onde o fluxo gênico ocorre somente entre populações adjacentes.

APOIO

Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2018/07596-0); Fundação de Apoio à Extensão e Pesquisa da UNICAMP (FAEPEX 2002/19); e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC 124255/2019-1)

REFERÊNCIAS

Antonelli A. et al, 2018. Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. PeerJ, 6, e5644.

Barbará, T., Martinelli, G., Palma-Silva, C., Fay, M.F., Mayo, S. and 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(1), pp.65-77.

Berli P (2004) Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. *Molecular Ecology* 13, 827-836.

Benzing DH, 2000. Bromeliaceae - profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge.

Conceição AA, Giulietti AM, Meirelles ST, 2007. Ilhas de vegetação em afloramentos de quartzito- arenito no Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 335–347.

Dieringer D, Schlötterer C., 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3, 167–169.

Chaves AV, Freitas GHS, Vasconcelos MF, Santos F, 2014. Biogeographic patterns, origin and speciation of the endemic birds from eastern Brazilian mountaintops: a review. *Systematics and Biodiversity* 2000: 1–16.

Domingues, R., Machado, M.A., Forzza, R.C., Melo, T.D., Wohlfres-Viana, S. and Viccini, L.F., 2011. Genetic variability of an endangered Bromeliaceae species (*Pitcairnia albiflos*) from the Brazilian Atlantic rainforest. *Genetics and Molecular Research*, 10(4), pp.2482-2491.

Excoffier L, Lischer HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software

STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611–2620.

Giulietti AM, Pirani JR, Harley RM, 1997. Espinhaço Range region, Eastern Brazil. In: Davis SD., Heywood VH., Herrera-Macbride O., Villa-Lobos J., Hamilton AC, eds. *Centres of plant diversity: a guide and strategy for their conservation*. IUCN Publication Unit, Cambridge, pp. 397–404.

Givnish TJ et al, 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55–78.

Goudet, J., 1995. FSTAT: a computer program to calculate F statistics. Version 2.9. 3.2. *J Heredity*, 86, pp.485-486

Hartl, D.L. and Clark, A.G., 2010. *Princípios de Genética de Populações-4*. Artmed Editora.

Knowles LL, Richards CL, 2005. Importance of genetic drift during Pleistocene divergence as revealed by analyses of genomic variation. *Molecular Ecology* 14: 4023–4032.

Lavor P, van den Berg C, Jacobi CM, Carmo FF, Versieux L de M, 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101: 1167–1175.

Leal BSS, Palma-Silva C, Pinheiro F, 2016. Phylogeographic studies depict the role of space and time scales of plant speciation in a highly diverse Neotropical region. *Critical Reviews in Plant Sciences* 0: 1–16.

Neri, J., Wendt, T., Leles, B., Dos Santos, M.F. and Palma-Silva, C., 2017. Variation in reproductive systems facilitates species boundaries of sympatric *Vriesea* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 184(2), pp.272-279.

Paggi, G.M., Palma-Silva, C., Silveira, L.C., Kaltchuk-Santos, E., Bodanese-Zanettini, M.H. and Bered, F., 2007. Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) in southern Brazil. *American Journal of Botany*, 94(4), pp.683-689.

Rapini A, Ribeiro P, Lambert S, Pirani J, 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 16–24.

Soares, L.E., Goetze, M., Zanella, C.M. and Bered, F., 2018. Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. *Genetics and molecular biology*, (AHEAD), pp.0-0.

Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C, 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular ecology* 22: 1193–213.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–59.

Versieux L de M, Elbl PM, Das Graças Lapa Wanderley M, Luiza De Menezes N, 2010. *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. *Nordic Journal of Botany* 28: 385–397.

Versieux L de M, Wendt T, Louzada RB, Wanderley M das GL, 2008. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 99–110.

Wang IJ, Bradburd GS, 2014. Isolation by environment. *Molecular Ecology* 23: 5649–56.