



Transferência de marcadores microssatélite em indivíduos de *Vriesea* spp. naturais da Ilha de Alcatrazes

Palavras-Chave: microevolução, genética de populações, SSR.

Autores(as):

Maria Eduarda Visentini¹

Amanda Lichtscheidl Graciadio¹

Tami da Costa Cacossi¹

Gabriel Pavan Sabino¹

Dr^a. Bárbara Simões Santos Leal¹

Prof. Dr. Fábio Pinheiro¹

Prof^a. Dr^a. Clarisse Palma da Silva (orientadora)¹

¹Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genômica de Plantas (LEEG), Departamento de Biologia Vegetal, IB, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A formação de novas espécies decorre do fenômeno de isolamento reprodutivo, quando seres aparentados acumulam tantas diferenças entre si que a troca de material genético torna-se restrita, seja por incompatibilidades morfológicas e/ou moleculares. O isolamento reprodutivo pode ter diversas origens, mas, muitas vezes, é consequência do isolamento geográfico, que dificulta o encontro dos indivíduos e seus gametas. Sem fluxo gênico capaz de homogeneizar as populações, as mutações que ocorrem no genoma de cada indivíduo se acumulam devido aos efeitos da deriva e/ou seleção natural, tornando-os incompatíveis o suficiente para delimitar espécies distintas (Raven, 2014).

Ilhas encontram-se isoladas do continente por uma barreira oceânica, sendo locais propícios para o estudo de especiação. Neste projeto, selecionamos a ilha de Alcatrazes para estudar os efeitos da interrupção do fluxo gênico no processo de formação de novas espécies. Esta ilha é considerada um refúgio de vida selvagem, com presença humana restrita (Hoff et al., 2015) e abrigando grande diversidade biológica, incluindo numerosas espécies endêmicas, o que reforça a necessidade de estudos para sua proteção (ICMBio, 2017). Localizada na região Neotropical, litoral Norte de São Paulo, a ilha encontra-se isolada do continente desde o Quaternário (Martins et. al, 2014).

Sua vegetação é caracterizada por áreas de mata atlântica e campos rupestres (ICMBio, 2017). Entre os grupos de plantas que podem ser encontrados no arquipélago, há diversas espécies de Bromeliaceae.



Figura 1: A ilha de Alcatrazes

A família Bromeliaceae é uma das famílias de angiospermas nativas da região Neotropical mais ricas em espécies (Givnish et al., 2011). Mas sua significância não se restringe ao número de espécies: é importante, também, pelas relações ecológicas que desenvolve, seja com outras plantas, microrganismos, ou animais, como a Perereca-de-Alcatrazes (*Scinax alcatraz*), anfíbio ameaçado de extinção, que depende dessas plantas para se reproduzir (Lisboa et al., 2021). A sobrevivência de diversos organismos só é possível graças ao microambiente formado pelo acúmulo de água entre as folhas dispostas em roseta das bromélias (Dias et al., 2014). Este projeto tem foco em bromélias do gênero *Vriesea* Lindl., um dos mais biodiversos entre as bromélias, contando com 222 espécies (Gouda et al., 2023). O gênero *Vriesea*, com poucas exceções, é endêmico e bastante característico do Cerrado e da Mata Atlântica, biomas brasileiros considerados *hotspots* sob grande ameaça (Kessous et al., 2019). As plantas foram coletadas em populações da ilha de Alcatrazes, e compõem duas espécies: *Vriesea* cf. *tijucana* e *Vriesea procera*.

Utilizaremos marcadores moleculares de DNA microssatélites, ou SSRs (*simple sequence repeats*). Esses marcadores são sequências de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, encontrados em regiões codificantes ou não do DNA. Suas altas taxas de polimorfismo, ampla distribuição no genoma, herdabilidade e codominância tornam os marcadores SSR muito informativos em diversos tipos de estudos genéticos, entre eles, o estabelecimento de parentesco evolutivo (Parida et al., 2009). Uma das limitações dos SSRs, no entanto, é o fato de não terem sido desenvolvidos marcadores para muitas espécies conhecidas, o que torna importantes trabalhos de transferência heteróloga, como este.

O estudo da estrutura genética de plantas pertencentes a um gênero tão rico em espécies e interações ecológicas, em um contexto de isolamento geográfico, no qual se espera observar o processo de especiação em ocorrência, nos permite analisar e disponibilizar dados acerca da grande biodiversidade em regiões fragmentadas neotropicais, lançando luz sobre a necessidade de preservação de locais como Alcatrazes, que abriga 835 *taxa*, sendo muitos deles endêmicos e ameaçados (Hoff et al., 2022).

Objetivos

Este projeto de Iniciação Científica é vinculado ao projeto “Ecologia e Evolução de plantas em ambientes insulares: um estudo sobre a origem da Flora da Ilha de Alcatrazes” do Professor Fábio Pinheiro, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, contando com a colaboração da Profa. Clarisse Palma, orientadora deste estudo. Objetivamos otimizar um conjunto de *loci* para estudos da diversidade e estrutura genética populacional dessas espécies, para as quais ainda não há marcadores genéticos específicos, sendo o conhecimento da diversidade genética a base para o estabelecimento de medidas de conservação.

METODOLOGIA:

1. Coleta dos indivíduos e extração do DNA

Foram coletados em Alcatrazes 20 indivíduos por população de cada espécie selecionada, *Vriesea* cf. *tijucana* e *Vriesea procera*. Os indivíduos foram mantidos sob condições controladas na casa de vegetação do Instituto de Biologia da Unicamp. Para a extração do DNA genômico total, utilizamos o método CTAB, de acordo com o protocolo de Tel-Zur et al. (1999).

2. Reação de amplificação em cadeia (PCR)

Oito amostras de cada espécie foram submetidas aos primeiros testes de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Selecionamos 26 *loci* com base em trabalhos publicados de desenvolvimento de

marcadores SSR no gênero *Vriesea* (Palma-Silva et al. 2007; Neri et al. 2014, Cacossi et al. 2019), e que tenham obtido sucesso na amplificação heteróloga (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers selecionados para utilização nas reações de PCR nos oito indivíduos de *Vriesea*

Espécie	Subfamília	Autor	Loci	Tamanho (pb)
<i>Vriesea gigantea</i> Mart. ex Schult. f.	Tillandsioideae	Palma-Silva et al. (2007)	VgA04	187–215
			VgA06	223–253
			VgB01	156–162
			VgB06	201–223
			VgB10	119–156
			VgC01	208–218
			VgF01	154–199
			VgF02	176–204
			VgG02	241–259
			VgG03	209–213
<i>Vriesea simplex</i> (Vell.) Beer	Tillandsioideae	Neri et al. (2015)	VgG05	152–204
			Vs01	181-266
			Vs02	239-258
			Vs06	137-188
			Vs08	203-229
			Vs09	306-329
			Vs10	187-196
<i>Guzmania monostachya</i> Sw.	Tillandsioideae	Boneh et al. (2003)	Vs17	161-185
			Vs18	295-297
			Vs19	264-292
			Vs20	283-312
			CT5	189
<i>Pitcairnia albiflos</i> Herb.	Pitcairnioideae	Paggi et al. (2008)	PaA10	146–149
			PaC05	149–153
			PaD07	233–239
			PaZ01	185–199

As reações de PCR foram efetuadas em tubos contendo uma solução de 12 µL cada, constituída por 2 µL de DNA genômico, 5x GoTaq Master Mix (Promega Corporation), 5 pmol *forward* primer, 10 pmol *reverse* primer e 1 pmol universal M13 universal primers (FAM). Utilizamos o equipamento Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), aplicando-se um programa “*touchdown*”, conforme protocolo descrito por Palma-Silva (2007).

3. Genotipagem

Os fragmentos amplificados foram genotipados utilizando o equipamento ABI 3500 DNA Analyzer Sequencer (Applied Biosystem) e a escala de tamanho de fragmento GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystem). Para a análise do tamanho dos *loci* e visualização de possível polimorfismo, utilizamos o programa Geneious 10.2.6 (Dotmatics, Bishop's Stortford, Reino Unido), realizando inspeção manual.

4. Análise de dados

Futuramente, estatísticas sumárias de diversidade serão calculadas através do programa R v4.1.0 (R Core Team, 2021), utilizando o pacote *diveRsity* (Keenan et. al, 2013), calculando: número de alelos por *locus*

(A), riqueza alélica de cada *locus* (AR), heterozigosidade esperada (HE) e observada (HO), e o coeficiente de endocruzamento (FIS). O Genepop v3.5 (Raymond & Rousset, 1995) e FSTAT versão 2.9.3.2 (Goudet, 1995), serão utilizados para análises de equilíbrio de Hardy–Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação. Análises da estrutura genética das populações serão realizadas com o programa Structure v2.3.4 (Pritchard et. al, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. *Vriesea procera*

A análise de genotipagem evidenciou a transferência de 13 entre os 26 *loci* selecionados, sendo todos monomórficos. Portanto, os indivíduos dessa população são geneticamente idênticos para os marcadores testados, o que é esperado devido à baixa diversidade genética intrapopulacional, comum neste gênero. A ausência de polimorfismo impede estudos futuros sobre a diversidade genética na espécie, no entanto, trata-se de um resultado informativo acerca da população coletada.

2. *Vriesea cf. tijuana*

Até o momento, verificou-se a transferência de 8 entre os 26 *loci* selecionados. Em uma análise inicial, foi observado polimorfismo em três destes *loci*, desta forma, mais testes de transferência serão realizados para a obtenção de dados suficientes para prosseguir com as análises acerca da estrutura populacional desta espécie e, futuramente, poderemos comparar esta população com populações continentais, podendo avaliar o processo de isolamento e especiação.

Tabela 2 - *Locí* testados e resultados obtidos até o momento

Primer	Tamanho (bp)	<i>Vriesea procera</i>		<i>Vriesea cf. tijuana</i>	
		Amplificação	Polimorfismo	Amplificação	Polimorfismo
VgA04	187–215	Sim	Não	Sim	Não
VgB01	156–162	Sim	Não	Sim	Não
VgB06	201–223	Sim	Não	Sim	Sim
VgC01	208–218	Sim	Não	Sim	Sim
VgF02	176–204	Sim	Não	Sim	Não
VgG02	241–259	Não	-		
VgG03	209–213	Sim	Não	Sim	Não
Vs02	239-258	Sim	Não	Sim	Não
Vs06	137-188	Não	-		
Vs08	203-229	Não	-		
Vs10	187-196	Sim	Não	Sim	Sim
Vs17	161-185	Sim	Não		
Vs19	264-292	Sim	Não		
Vs20	283-312	Sim	Não		
CT5	189	Sim	Não		
PaA10	146–149	Não	-		
PaC05	149–153	Não	-		
PaD07	233–239	Sim	Não		
PaZ01	185–199	Não	-		

CONCLUSÕES:

O fato dos indivíduos de *Vriesea procera* serem geneticamente idênticos indica a ausência de fecundação cruzada e evidencia uma baixa diversidade genética intrapopulacional. A ausência de variabilidade genética é um risco para as populações, uma vez que qualquer alteração ambiental a qual aquele genótipo não possua adaptação é capaz de extinguir todos os indivíduos. Desta forma, a espécie *V. procera* é um exemplo de organismo que poderá desaparecer de Alcatrazes caso medidas de conservação não sejam aplicadas. Considerando que as bromélias abrigam e sustentam outros organismos, a perda desta planta na ilha poderia significar grande prejuízo para diversas outras espécies. Já em relação à espécie *Vriesea* cf. *tijucana*, os resultados preliminares indicam a presença de polimorfismos, que poderão ser utilizados para estimar, futuramente, os níveis de variabilidade genética e testar o isolamento em relação às populações do continente. Nos próximos meses, nos aprofundaremos no estudo dessa variabilidade.

BIBLIOGRAFIA

- Boneh L, Kuperus P, van Tienderen H. **Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya***. Mol Ecol Notes 3:302–303, 2003
- Cacossi, T., Dantas-Queiroz, M.V. & Palma-Silva, C. **Transferability of nuclear microsatellites markers to *Vriesea oligantha* (Bromeliaceae), an endemic species from Espinhaço Range, Brazil**. Braz. J. Bot 42, 727–733, 2019
- Dias, M. L., Prezoto, F., Abreu, P. F., Neto, L. M. **Bromélias e suas principais interações com a fauna**. CES REVISTA, Juiz de Fora, v. 28, n. 1. p. 3-16, jan./dez. 2014 – ISSN 1983-1625., pp. 3–16, 2014
- Dieringer D, Schlötterer C. **Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets**. Mol Ecol Notes 3:167–169, 2003
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. **Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny**. Am J Bot 98:872–895, 2011
- Gouda, E.J., Butcher, D. & Dijkgraaf, L. (cont.updated) **Encyclopaedia of Bromeliads**, Version 5. Utrecht University Botanic Gardens, online <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> (accessed: [09-02-2023]).
- Goudet J (1995) **FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics**. J Hered 86:485–486
- Hoff, N. T., Takase, L. S., Siegle, E., & Dias, J. F. **Mapeamento da sensibilidade ambiental a derrames de óleo no arquipélago dos Alcatrazes (São Paulo, Brasil)**. Journal of Integrated Coastal Zone Management, 22(1), 43–80, 2022
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). **Plano de manejo da Estação Ecológica Tupinambás e refúgio de vida silvestre do arquipélago de Alcatrazes Brasília: ICMBIO**. 2007
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W., & Prodöhl, P.A., **diversity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors**, Methods in Ecology and Evolution, 2013
- Kessous, Igor & Neves, Beatriz & Dayvid, Couto & Paixão-Souza, Bruno & Pederneiras, Leandro & Moura, Ricardo & Barfuss, Michael & Salgueiro, Fabiano & Costa, Andrea. **Historical biogeography of a Brazilian lineage of Tillandsioideae (subtribe Vrieseinae, Bromeliaceae): the Paranaean Sea hypothesized as the main vicariant event**. Botanical Journal of the Linnean Society. 192. 625–641. 10.1093, 2019
- MARTINS, L., GARCIA, M. G. M. & REVERTE, F. C. **Geologia do arquipélago de Alcatrazes, litoral norte do Estado de São Paulo**. In: Anais do 47o Congresso Brasileiro de Geologia, 21-26 Set. 2015, Salvador, BA, pp. 290, 2014
- Neri J, Nazareno AG, Wendt T, Palma-Silva C. **Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae**. Biochem Syst Ecol 58:34–37, 2014
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bered F, Cidade FW, Sousa ACB, Souza AP, Wendt T, Lexer C. **Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic Rainforest, and cross-amplification in other species**. Mol Ecol Resour 8:980–982, 2008
- Palma-Silva C, Cavallari MM, Barbará T, Lexer C, Gimenes MA, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. **A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species**. Mol Ecol Notes 7:654–657, 2007
- Parida, S.K., Kalia, S.K., Kaul, S. et al. **Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane**. Theor Appl Genet 118, 327–338, 2009
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2021
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2014). **Biologia Vegetal** (8th ed.). Guanabara Koogan.
- Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): **population genetics software for exact tests and ecumenicism**. J Hered 86:248–249, 1995
- Tel-Zur N, Abbo S, Myslabodski D, Mizrahi Y. **Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae)**. Plant Mol Biol 17:249–254, 1999
- The basic algorithm was described by Pritchard, Stephens & Donnelly (2000). Extensions to the method were published by Falush, Stephens and Pritchard (2003), and (2007) and Hubisz, Falush, Stephens and Pritchard (2009).