



# TRANSFERÊNCIA DE MARCADORES DE MICROSSATÉLITES EM INDIVÍDUOS DE *Tillandsia* sp. nov. DA ILHA DE ALCATRAZES

Palavras-Chave: MICROEVOLUÇÃO, ESPECIAÇÃO, GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Autores(as):

AMANDA LICHTSCHEIDL GRACIADIO\*

MARIA EDUARDA VISENTINI\*

TAMI DA COSTA CACOSI\*

GABRIEL PAVAN SABINO\*

Prof. Dr. FÁBIO PINHEIRO\*

Dr<sup>a</sup> BÁRBARA SIMÕES SANTOS LEAL (co-orientadora)\*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. CLARISSE PALMA DA SILVA (orientadora)\*

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

## INTRODUÇÃO:

Ambientes insulares são laboratórios naturais para o desenvolvimento de estudos que envolvam os processos evolutivos, apresentando um microcosmos temporal e espacial para o estudo (Crawford & Stuessy, 1997; Emerson, 2002). Entre os fatores que tornam ilhas e arquipélagos ideais para o estudo de microevolução estão suas barreiras bem definidas e seu tamanho reduzido, além de serem relativamente mais jovens que o continente, permitindo que a biota desenvolva uma história evolutiva única, com interações ecológicas e pressões seletivas próprias (Losos & Ricklefs, 2009).

A Ilha de Alcatrazes, localizada a 35km da costa do litoral norte de São Paulo, é a maior de cinco ilhas que formam o Arquipélago de Alcatrazes e destaca-se por sua vegetação rupícola, associada a afloramentos graníticos e por manchas de Floresta Atlântica, que se desenvolvem em áreas onde há acúmulo de solo (Visnadi & Vital, 2001). O isolamento da ilha desde o Pleistoceno tem favorecido o acúmulo de grande diversidade de espécies endêmicas, sejam elas vegetais como *Anthurium alcatrazense* (Coelho et. al, 2008) ou animais como *Bothropoides alcatraz* (Marques et. al, 2002).



Figura 1- Ilha de Alcatrazes

Dentre a flora da Ilha de Alcatrazes, destacam-se espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae da subfamília Tillandsioideae, mais especificamente às pertencentes ao gênero *Tillandsia* que, uma vez separadas das populações do continente, estão inclusas no microcosmos evolutivo da ilha e suscetíveis a processos de isolamento reprodutivo. As espécies da subfamília Tillandsioideae possuem grande diversidade morfológica, grande abrangência ecológica (Chaves et al., 2018) e alta variedade de sistemas de reprodução, incluindo desde espécies auto-incompatíveis e parcialmente auto-compatíveis, a espécies exclusivamente endogâmicas (Orozco-Ibarrola, 2015). Sabe-se, ainda, que os diferentes



Figura 2 - *Tillandsia alcatrazensis* em afloramento rochoso da Ilha de

sistemas de reprodução possuem ligação direta com os níveis de variabilidade genética e fluxo gênico de uma espécie, impactando na variação genética intra- e interpopulacional (Orozco-Ibarrola, 2015; Chaves et al., 2018). Neste projeto, a espécie recém-descrita *Tillandsia* sp. nov. (Sabino et al. 2023), endêmica da Ilha de Alcatrazes, é utilizada como modelo de estudo para investigação da diversidade e estrutura genética e melhor entendimento dos processos evolutivos e ecológicos estabelecidos na ilha.

Dentre alguns marcadores moleculares possíveis para esse estudo, as Sequências Simples Repetitivas, ou SSRs (também conhecidas como microssatélites) são extremamente valiosas no estabelecimento de relações genéticas e evolutivas. Por definição, as SSRs são repetições em tandem de um a seis nucleotídeos espalhadas pelo genoma de organismos eucariotos; características pelo seu alto grau de polimorfismo (diferentes alelos para um mesmo *locus*) e sua natureza codominante, além de ampla distribuição e cobertura genômica. (Powell 1996; Chaves et al. 2018, Parida 2008). As SSRs são, ainda, flanqueadas por sequências únicas de nucleotídeos (Parida 2008), permitindo o desenvolvimento de iniciadores específicos para a replicação da região. Vários iniciadores de SSRs vem sendo desenvolvidos com sucesso para a família Bromeliaceae de maneira geral (e.g., Boneh et al. 2003; Palma-Silva et al. 2007; Neri et al. 2015), e, embora haja determinada escassez de iniciadores específicos para o gênero *Tillandsia*, muitos dos primers já desenvolvidos exibiram sucesso em amplificações cruzadas entre gêneros diferentes (e.g., Wöhrmann and Weising 2011; Goetze et al. 2013).

**Objetivos:** Desta forma, considerando a escassez de marcadores específicos para o gênero *Tillandsia*, e o sucesso prévio de amplificações cruzadas, nós objetivamos testar a transferência desses iniciadores e otimizar um conjunto de loci para estudos de diversidade e estruturação genética populacional de *Tillandsia* sp. nov., permitindo a futura análise genética comparativa entre populações, bem como a maior compreensão da flora da Ilha de Alcatrazes.

## METODOLOGIA:

(1) Foi realizada a coleta de 40 indivíduos de duas subpopulações da Ilha de Alcatrazes (uma mais ao norte e uma mais ao sul) seguida da manutenção desses indivíduos na casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal da Unicamp.

(2) Em seguida, foi realizada a extração do DNA genômico total dos 40 indivíduos através do método CTAB, a partir de folhas frescas e jovens (protocolo de Tel-Zur et al. 1999). A qualidade e quantificação dos DNAs extraídos foram avaliadas em gel de agarose 2% corados com GelRed (Biotium, Hayward, Califórnia, EUA).

(3) Oito amostras com melhor qualidade foram selecionadas e submetidas a Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação de loci de SSR nucleares previamente desenvolvidos para outras espécies de Bromeliaceae (Tabela 1 - Cacossi et al. 2019; Palma-Silva et al. 2007; Chaves et al. 2018).

**Tabela 1** - Loci selecionados para amplificação de oito amostras de DNA das Tillandsias.

Autor	Espécie	Subfamília	Loci	Tamanho (pb)
Aoki-Gonçalves et al. (2014)	<i>Orthophytum ophiuroides</i> Louzada & Wand.	Bromelioideae	Op77	151-168
			Op13	208-216
Boneh et al. (2003)	<i>Tillandsia fasciculata</i> Sw.	Tillandsioideae	E6	148
			E6B	151
			E19	137
			P2P19	204
Neri et al. (2015)	<i>Guzmania monostachya</i> Sw.	Tillandsioideae	CT5	189
			<i>Vriesea simplex</i> (Vell.) Beer	Tillandsioideae
Vs8	203–229			
Vs10	187–196			
Paggi et al. (2008)	<i>Pitcairnia albiflos</i> Herb.	Pitcairnioideae	PaA10	146–149
			PaD07	233–239
Palma-Silva et al. (2007)	<i>Vriesea gigantea</i> Mart. ex Schult. f.	Tillandsioideae	VgC01	208–218
			VgA04	200–225
			VgB01	156-162
			VgB06	201–223
			VgF02	176–204
Wöhrmann and Weising (2011)	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	Bromelioideae	Acom12.12	196
			Acom78.4	193–205
Wöhrmann et al. (2012)	<i>Fosterella rusbyi</i> (Mez) L.B.Sm.	Pitcairnioideae	NgFos12	178
			NgFos11	162

(4) Sendo confirmada a amplificação dos loci testados, foi realizada genotipagem no equipamento ABI 3500 DNA Analyzer Sequencer (Applied Biosystem) com a escala de tamanho de

fragmento GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystem). Os alelos então foram inspecionados manualmente utilizando o software Genious 10.2.6 (Dotmatics, Bishop's Stortford, Reino Unido).

(5) As análises de variabilidade genética intrapopulacional foram realizadas com o pacote do R v4.1.0 (R Core Team, 2021) “diveRsity” 1.9.90 (Keenan et. al, 2013), gerando os dados de alelos observados por locus (A), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), além do desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Futuramente os programas Genepop v3.5 (Raymond & Rousset, 1995) e FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 1995) serão utilizados para análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação. A estrutura genética da população ainda será analisada com o programa Structure v2.3.4 (Pritchard et. al, 2000).

## RESULTADOS PRÉVIOS E DISCUSSÃO:

Após a terceira etapa da metodologia, 82% dos *loci* pré-selecionados com base na literatura para Bromeliaceae (Cacossi et al. 2019; Palma-Silva et al. 2007; Chaves et al. 2018) mostraram sucesso de transferibilidade durante a etapa de PCR, totalizando 18 loci. É, portanto, possível depreender uma alta taxa de sucesso na transferibilidade de marcadores microssatélite entre diferentes gêneros dentro da família Bromeliaceae.

Desses 18 loci, até o momento 12 foram genotipados e tiveram seus alelos manualmente inspecionados, sendo 50% deles altamente polimórficos. A partir desses, foi possível realizar as análises de variabilidade genética da população, obtendo os parâmetros descritos na Tabela 2.

**Tabela 2 – Resultados da análise de variabilidade genética intrapopulacional.** Número de indivíduos amostrados(N), número de alelos observados por locus (A), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ). \*Desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ).

	<b>N</b>	<b>A</b>	<b><math>H_E</math></b>	<b><math>H_O</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>
<b>ACOM12.12</b>	8	4	0,700	0,620	0,101*
<b>ACOM78.4</b>	8	5	0,770	0,500	0,354*
<b>NGFOS12</b>	6	4	0,620	0,830	-0,333*
<b>VGA04</b>	8	4	0,660	0,250	0,619*
<b>VGB06</b>	8	3	0,480	0,380	0,213*
<b>VS10</b>	8	6	0,770	0,750	0,020

O número de alelos observados nos mostra as altas taxas de polimorfismo nos loci selecionados. Os dados preliminares de heterozigosidade também revelam grande variabilidade genética entre os indivíduos de *Tillandsia* sp. nov. Essa variabilidade genética dificulta, por exemplo, a extinção dessa população única e endêmica, quando colocada sob alguma pressão seletiva desfavorável. Entretanto, os coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) por locus variaram de médios a elevados, o que sugere altas taxas de cruzamentos entre indivíduos aparentados e/ou de endocruzamentos nesta espécie. Desvios

significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram evidenciados em todos loci amostrados, com exceção do locus VS10.

## CONCLUSÕES:

Com a observação dos polimorfismos e da consequente variabilidade genética intrapopulacional bem como os níveis de heteroziguidade e endocruzamento, podemos entender com mais clareza como funcionam as dinâmicas dessa população específica de *Tillandsia* sp. nov.. Por ser mais uma espécie endêmica da Ilha de Alcatrazes, a coleta e análise desses dados colabora para a construção de um panorama mais completo sobre a composição e conservação da flora da ilha. Há ainda a possibilidade e intenção futura de articular esses dados com outras espécies de *Tillandsia* filogeneticamente próximas, encontradas no continente, servindo de base para novos estudos evolutivos.

---

## BIBLIOGRAFIA

- BONEH L, KUPERUS P, VAN TIENDEREN PH (2003) **Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya***. Mol Ecol Notes 3:302–303
- 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). <https://doi.org/10.1007/s40415-019-00560-z>
- CHAVES, C. J. N., AOKI-GONÇALVES, F., LEAL, B. S. S., ROSSATTO, D. R., & PALMA-SILVA, C. (2018). **Transferability of nuclear microsatellite markers to the atmospheric bromeliads *Tillandsia recurvata* and *T. aeranthes* (Bromeliaceae)**. Brazilian Journal of Botany. doi:10.1007/s40415-018-0494-4
- COELHO, M. A. N., and CATHARINO, E. L. M. "Duas espécies novas de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil." *Rodriguésia* 59 (2008): 829-833.
- CRAWFORD, D. J., & STUESSY, T. F. (1997). **Plant Speciation on Oceanic Islands. Evolution and Diversification of Land Plants**, 249–267. doi:10.1007/978-4-431-65918-1\_12
- GOETZE MM, LOUZADA RB, WANDERLEY MGL et al (2013) **Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads**. Biochem Syst Ecol 48:194–198
- GOUDET J (1995) **FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics**. J Hered 86:485–486
- 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
- LOSOS, J. B., & RICKLEFS, R. E. (2009). **Adaptation and diversification on islands**. Nature, 457(7231), 830–836. doi:10.1038/nature07893
- MARQUES, O.A.V.; MARTINS M., SAZIMA, I. **A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae)**. Herpetologica 58: 303-312, 2002
- NERI J, NAZARENO AG, WENDT T, PALMA-SILVA C (2015) **Development and characterization of microsatellite markers for *Vriesea simplex* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other species of Bromeliaceae**. Biochem Syst Ecol 58:34–37
- OROZCO-IBARROLA, O. A., FLORES-HERNÁNDEZ, P. S., VICTORIANO-ROMERO, E., CORONA-LÓPEZ, A. M., & FLORES-PALACIOS, A. (2014). **Are breeding system and florivory associated with the abundance of *Tillandsia* species (Bromeliaceae)?** Botanical Journal of the Linnean Society, 177(1), 50–65. doi:10.1111/boj.12225
- PALMA-SILVA, C., CAVALLARI, M. M., BARBARÁ T., LEXER, C., GIMENES, M. A., BERED, F., & BODANESE-ZANETTINI, M. H. (2007). **A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species**. Molecular Ecology Notes, 7(4), 654–657. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01665.x
- PARIDA, S. K., KALIA, S. K., KAUL, S., DALAL, V., HEMAPRABHA, G., SELVI, A., ... MOHAPATRA, T. (2008). **Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane**. Theoretical and Applied Genetics, 118(2), 327–338. doi:10.1007/s00122-008-0902-4
- POWELL, W., MACHRAY, G. C., & PROVAN, J. (1996). **Polymorphism revealed by simple sequence repeats**. Trends in Plant Science, 1(7), 215–222. doi:10.1016/1360-1385(96)86898-1
- RAYMOND M, ROUSSET F. **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism**. J Hered 86:248–249, 1995
- SABINO G P, LEODEGARIO M M, MARCUSSO G M, SHIMIZU G H, KOCH I, TAVARES D U, PINHEIRO F (2023) ***Tillandsia alcatrazensis* (Bromeliaceae), a new endemic species from Alcatrazes island in southeast Brazil: A new species of *Tillandsia***. No prelo.
- TEL-ZUR N, ABBO S, MYSLABODSKY D, MIZRAHI Y (1999) **Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae)**. Plant Mol Biol Rep 17:249–254
- VISANDI, S. R. e VITAL, D. M. **Briófitas das ilhas de Alcatrazes, do Bom Abrigo, da Casca e do Castilho, Estado de São Paulo, Brasil**. Acta Botanica Brasílica [online]. 2001, v. 15, n. 2, pp. 255-270. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-33062001000200011>>.
- WOHRMANN T, WEISING K (2011) **In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae**. Theor Appl Genet 123:635–647
- 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).