

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; Raphael da Silva¹; 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:

Ilhas são laboratórios naturais para o estudo do processo de especiação, graças ao isolamento reprodutivo gerado pela barreira oceânica (Cox & Moore, 2009). Neste projeto, selecionamos a ilha de Alcatrazes, localizada na região Neotropical, litoral Norte de São Paulo, para estudar os efeitos da interrupção do fluxo gênico no processo de formação de novas espécies. Esta ilha é recoberta por vegetação típica de mata atlântica e campos rupestres, e é considerada um refúgio de vida selvagem que abriga grande diversidade biológica, incluindo numerosas espécies endêmicas, o que reforça a necessidade de estudos para sua proteção (ICMBio, 2017).

Entre os grupos de plantas presentes em Alcatrazes, há diversas espécies de Bromeliaceae. A família Bromeliaceae é uma das famílias de angiospermas nativas da região Neotropical mais ricas em espécies (Givnish et al., 2011). Além da diversidade taxonômica, as bromélias apresentam grande importância ecológica: 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), como a Perereca-de-Alcatrazes (*Scinax alcatraz*), anfíbio ameaçado de extinção, que depende dessas plantas para se reproduzir (Lisboa et al., 2021). O gênero *Vriesea* Lindl., é um dos mais biodiversos entre as bromélias, contando com 222 espécies (Gouda et al., 2023). É um gênero endêmico e bastante característico do Cerrado e da Mata Atlântica, biomas brasileiros considerados hotspots sob grande ameaça (Kessous et al., 2019). Neste projeto, estudamos duas espécies de *Vriesea* encontradas em Alcatrazes: *Vriesea* cf. *tijucana* e *Vriesea procera*.

Obtivemos sucesso na transferência de marcadores moleculares de DNA microssatélites, ou SSRs (*simple sequence repeats*) de outras espécies de Bromeliaceae para as duas espécies que estudamos. As altas taxas de polimorfismo, ampla distribuição no genoma, herdabilidade e

codominância tornam os marcadores SSR muito informativos em diversos tipos de estudos genéticos (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. A partir dos SSR, observamos que a diversidade genética em ambas as espécies é bastante baixa. A partir desses resultados, optamos por uma segunda análise, utilizando o sequenciamento por RAD-seq, uma ferramenta que permite uma visão mais ampla do genoma do que o SSR, para obtermos com maior robustez as estatísticas sobre a diversidade genética. A segunda análise corroborou a baixa diversidade genética nas populações estudadas.

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. Clárisse 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. O estudo da estrutura e diversidade genética de plantas pertencentes a um gênero tão rico em espécies e interações ecológicas, em um contexto de isolamento geográfico, nos permite analisar e disponibilizar dados acerca da grande biodiversidade em regiões fragmentadas neotropicais, lançando luz sobre a necessidade do estabelecimento de medidas de conservação em locais como Alcatrazes, que abriga 835 taxa, sendo muitos deles endêmicos e ameaçados (Hoff et al., 2022).

METODOLOGIA:

Coleta dos indivíduos e extração do DNA

Foram coletados 20 indivíduos de cada espécie selecionada, *Vriesea* cf. *tijucana* e *Vriesea procera*, os quais 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).

Reação de amplificação em cadeia (PCR)

Oito amostras de cada espécie foram submetidas aos testes de amplificação por PCR. Com base em trabalhos previamente 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, foram selecionados 26 loci. 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).

Genotipagem

Os fragmentos amplificados foram genotipados pelo 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, foi utilizado o programa Geneious 10.2.6 (Dotmatrix, Bishop's Stortford, Reino Unido), realizando inspeção manual.

Análise de dados (SSR)

Estatísticas sumárias de diversidade foram calculadas através do programa R v4.1.0 (R Core Team, 2021), utilizando o pacote *diveRcity* (Keenan et. al, 2013). Foram calculados o número de alelos por locus (A), riqueza alélica de cada locus (AR), heterozigosidade esperada (HE) e observada (HO), e o coeficiente de endocruzamento (FIS).

Sequenciamento por RAD-seq

Buscando uma visão mais ampla do genoma, o DNA genômico de cinco indivíduos de *Vriesea cf. tijuana* foi extraído e enviado para a empresa Floragenex Inc. (Eugene, Oregon, EUA), para a preparação de biblioteca e sequenciamento dos marcadores tipo RAD, com uso da enzima de restrição *SbfI* e barcodes específicos para cada amostra. A amplificação e sequenciamento de extremidade única (150 pb) foram realizados em faixa única da plataforma Illumina HiSeq 2000. Então, foi realizada uma limpeza dos dados usando o programa *iPyrad v.0.7.30* (Eaton, 2014), eliminando os barcodes e adaptadores adicionados durante o sequenciamento no Illumina, bem como reads considerados de baixa qualidade ($Q < 20$). Em seguida, foi realizado o SNP calling, também pelo *iPyrad v.0.7.30* (Eaton, 2014). Nessa etapa, os fragmentos são alinhados e agrupados, no intuito de identificar SNPs entre as variações presentes nos fragmentos. Um script de Python customizado foi utilizado para selecionar um SNP ao acaso para cada locus para análises que exigem SNPs não ligados. O software *VCFTOOLS v.0.1.17* (Danecek et al., 2011) foi utilizado para buscar apenas loci que sejam bialélicos (uma vez que SNPs multialélicos podem representar vieses de sequenciamento) e filtrar os dados de modo que a porcentagem de dados faltantes não ultrapassasse 30%.

Análise de dados (RAD-seq)

O pacote “*diveRcity*”, do programa R, foi utilizado para obter índices de diversidade como: número de alelos observados por locus (A), heterozigosidade esperada (HE), heterozigosidade observada (HO), e estatísticas F de Wright, como coeficiente de endogamia (FIS), coeficiente de diferenciação populacional (FST), e desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Vriesea procera

A análise de genotipagem evidenciou a transferência de 13 entre os 19 loci testados, sendo todos monomórficos. Estes resultados sugerem que os indivíduos dessa população são geneticamente idênticos para os marcadores testados, o que é esperado devido ao pequeno tamanho populacional desta espécie na ilha e também 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.

Vriesea cf. tijuana

Verificou-se a transferência de 19 entre os 28 loci testados. Foi observado polimorfismo em sete desses loci, desta forma, prosseguimos com as análises da estrutura populacional desta espécie. Analisando cinco entre esses loci polimórficos (tabela 1), observamos uma baixa heterozigiosidade ($H_o \leq 0,750$) e um baixo coeficiente de endogamia (F_{IS} próximo a zero). Apesar da elevada taxa de fecundação cruzada (evidenciada pelos baixos valores de F_{ST}), observamos um polimorfismo menor do que o esperado, considerando o elevado tamanho populacional desta espécie na ilha.

Tabela 1: Análise da diversidade genética da população de *Vriesea cf. tijuana*. Número de alelos por locus (A), Heterozigiosidade esperada (H_e) e observada (H_o), Coeficiente de endogamia (F_{IS}) e Número de indivíduos (N).

	A	H_e	H_o	F_{IS}	N
VGA06	2	0,500	0,330	0,333	6
VGB06	4	0,560	0,750	-0,333	8
VGC01	5	0,750	0,750	0	8
VS10	2	0,500	0,500	0	8
VS19	2	0,300	0,380	-0,231	8

O estudo com RAD-seq foi realizado em cinco indivíduos de *Vriesea cf. tijuana*. Obtivemos informações de 18.150 loci, uma cobertura de genoma bem mais significativa que os 28 loci de SSR anteriormente testados, no entanto, os resultados obtidos foram semelhantes (tabela 2).

Tabela 2: Análise da diversidade genética da população de *Vriesea cf. tijuana* a partir do sequenciamento RAD. Heterozigiosidade esperada (H_e) e observada (H_o), Coeficiente de endogamia (F_{IS}).

H_e	H_o	F_{IS}
0.342	0.262	0,234

Ao contrário de *Vriesea procera*, essas plantas não são clones e podemos observar que há variação genética. O coeficiente de endogamia não apresenta um valor elevado, indicando que há fecundação cruzada, ainda que a endogamia seja um pouco mais elevada do que a que esperávamos para uma população tão grande quanto a que encontramos em Alcatrazes.

Os índices de heterozigiosidade e endogamia foram semelhantes nos dois tipos de análise, tanto por SSR quanto por RAD, o que também não era esperado, devido à diferença na cobertura genômica que temos em cada análise. O RAD-seq fornece uma amostragem mais ampla do genoma, enquanto os SSR são mais limitados em tamanho e distribuição. Conforme mencionado anteriormente, o número de loci amostrados também é bastante discrepante nas duas análises (neste estudo, 18150 por RAD e 28 por SSR). Além disso, o RAD-seq detecta variações de nucleotídeos únicos (SNPs), enquanto os microssatélites detectam variações de tamanho dos alelos, isto é, o RAD-seq fornece uma análise mais detalhada, capaz de detectar variações mais sutis que o SSR. Mesmo com todas essas diferenças entre os métodos, os valores de diversidade obtidos foram bastante semelhantes, o

que indica que não são as regiões de microssatélites que são pouco variáveis na espécie, e sim que o genoma como um todo apresenta um grau de variação mais baixo que o esperado.

CONCLUSÕES:

O trabalho cumpriu com os objetivos propostos, verificando a transferência de marcadores do tipo microssatélites de outras espécies para as espécies de *Vriesea* aqui estudadas, o que é relevante pelo fato de não existirem marcadores desenvolvidos para elas, especificamente. Os loci otimizados permitiram análises relevantes de genética de populações. A partir desse trabalho, observamos estatísticas preocupantes em relação à diversidade dessas espécies, em especial de *Vriesea procera*, cuja população em Alcatrazes é constituída por clones, o que alerta para a necessidade de medidas de conservação na ilha, uma vez que perturbações no equilíbrio dessa população podem ser fatais para todos os indivíduos na ausência de variações genéticas.

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
- Cox, C.B. & Moore, P.D. 2009. Biogeografia: uma abordagem ecológica e evolucionária. Rio de Janeiro, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. 7ª ed. 398 pp.
- 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/encyclopaedia/> (accessed: [09-02-2023]).
- 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
- 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
- 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
- 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