



TRANSFERÊNCIA DE MARCADORES DE MICROSSATÉLITES EM INDIVÍDUOS DE *TILLANDSIA* SPP. DA ILHA DE ALCATRAZES, SP.

Palavras-Chave: BROMELIACEAE, GENÉTICA DE POPULAÇÕES, ECOLOGIA MOLECULAR

Autores(as):

AMANDA LICHTSCHEIDL GRACIADIO*

MARIA EDUARDA VISENTINI*

TAMI DA COSTA CACOSI*

GABRIEL PAVAN SABINO*

Prof. Dr. FÁBIO PINHEIRO*

Dr^a BÁRBARA SIMÕES SANTOS LEAL (co-orientadora)*

Prof^a. Dr^a. CLARISSE PALMA DA SILVA (orientadora)*

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

INTRODUÇÃO:

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

A Ilha de Alcatrazes, localizada a 35 km 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 com acúmulo de solo (Visnadi & Vital, 2001). O isolamento da ilha desde o Pleistoceno permite a observação de uma grande diversidade de espécies endêmicas, tanto vegetais como *Anthurium alcatrazense* (Coelho et. al, 2008), quanto animais como *Bothropoides alcatraz* (Marques et. al, 2002).

Dentre a flora da Ilha de Alcatrazes, destacam-se espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae da subfamília Tillandsioideae, especificamente do 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, ampla abrangência ecológica (Chaves et al., 2018). Além disso apresentam diversos sistemas reprodutivos, incluindo espécies auto-incompatíveis, parcialmente auto-compatíveis e espécies exclusivamente endogâmicas (Orozco-Ibarrola,

2015). O que influencia diretamente os níveis de variabilidade genética e fluxo gênico das espécies e impacta na variação genética intra- e interpopulacional (Orozco-Ibarrola, 2015; Chaves et al., 2018).

As Sequências Simples Repetitivas, ou SSRs (também conhecidas como microssatélites) são marcadores moleculares extremamente valiosos no estabelecimento de relações genéticas e evolutivas no estudo botânico. Por definição, as SSRs são sequências curtas de DNA com motivos repetidos em tandem, de um a seis nucleotídeos espalhadas pelo genoma de organismos eucariotos e procariotos. São marcadores moleculares multialélicos e codominantes, característicos pelo alto grau de polimorfismo e ampla distribuição e cobertura genômica, além de alta transferibilidade entre espécies filogeneticamente próximas. (Powell 1996; Chaves et al. 2018, Parida 2008).

Os marcadores SSRs, por serem flanqueados por sequências únicas de nucleotídeos (Parida 2008), permitem o desenvolvimento de iniciadores específicos para a replicação da região, como já foi realizado, com sucesso, para diversas espécies da família Bromeliaceae (e.g., Boneh et al. 2003; Palma-Silva et al. 2007; Neri et al. 2015). Aqui, neste trabalho, utilizamos como modelo de estudo uma população de espécie endêmica *Tillandsia alcatrazensis* (descrita durante o desenvolvimento deste projeto pelo Doutorando Gabriel Pavan Sabino do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Genômica de Plantas Unicamp - LEEG) para entendimento dos processos genéticos, evolutivos e ecológicos estabelecidos na ilha. Espera-se que uma vez que muitos dos *primers* já desenvolvidos exibiram sucesso em amplificações cruzadas entre gêneros diferentes (e.g., Wohrmann and Weising 2011; Goetze et al. 2013), esses resultados possam ser replicados para solucionar a escassez de iniciadores específicos para o gênero *Tillandsia*.

OBJETIVOS: Este estudo é parte de um amplo projeto de pesquisa sobre a origem da Flora da Ilha de Alcatrazes (São Sebastião - SP) com foco na ecologia e evolução de plantas em ambientes insulares, coordenado pelo prof. Fábio Pinheiro, e conta com a colaboração da professora Clarisse Palma-Silva. Nesse trabalho objetivamos analisar a transferibilidade de marcadores microssatélites de outras espécies de Bromeliaceae à população de *Tillandsia alcatrazensis* endêmica da Ilha de Alcatrazes, otimizando um conjunto de *loci* de SSRs para estudos posteriores de diversidade e estrutura genética das espécies de *Tillandsia* da Ilha. Ainda, com o objetivo de produzir conhecimento quanto às taxas de diversidade genética da espécie *Tillandsia alcatrazensis*, avaliou-se a estruturação genética populacional da única subpopulação da espécie encontrada na ilha de Alcatrazes.

METODOLOGIA:

1) Coleta de indivíduos, material vegetal: Foram coletados 40 indivíduos totalizando três espécies de *Tillandsias* (*T. araujei*, *T. gardneri* e *T. alcatrazensis*) de duas subpopulações na Ilha de Alcatrazes (uma mais ao norte e uma mais ao sul). Para esse projeto foram selecionados apenas os indivíduos de *Tillandsia alcatrazensis* Sabino & Leodegario, totalizando 23 indivíduos.

2) Extração de DNA com o método CTAB: Utilizando folhas frescas e jovens dos indivíduos, foram realizadas extrações de DNA genômico total utilizando o protocolo de Tel-Zur et al (1999). A qualidade e quantificação dos DNAs extraídos foram avaliados em gel de agarose 2% corados com GelRed (Biotium, Hayward, Califórnia, EUA).

3) Amplificação: Inicialmente, oito amostras foram submetidas a Reação 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) para a otimização de um grupo de *loci* para as análises da espécie. Após essa etapa, os sete *primers* com maior sucesso de amplificação nos oito indivíduos foram selecionados e utilizados para a amplificação dos demais 15 (destacados e em negrito na Tabela 1).

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

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
	<i>Guzmania monostachya</i> Sw.	Tillandsioideae	P2P19	204
			CT5	189
Neri et al. (2015)	<i>Vriesea simplex</i> (Vell.) Beer	Tillandsioideae	Vs2	239–258
			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) Genotipagem: As 23 amostras de *T. alcatrazensis* amplificadas com os 7 *primers* selecionados, foram encaminhadas para a etapa de genotipagem. Feita através do equipamento ABI 3500 DNA Analyzer Sequencer (Applied Biosystem) com a escala de tamanho de fragmento GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystem). Para as análises dos alelos de microssatélite, foi utilizado o software Genious 10.2.6 (Dotmatics, Bishop's Stortford, Reino Unido) com inspeção manual.

5) Análise de genética de populações: 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 (HE), heterozigosidade observada (HO), coeficiente de endogamia (FIS), além do desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Obtivemos uma alta taxa de sucesso na transferibilidade de marcadores microssatélite entre diferentes gêneros dentro da família Bromeliaceae durante a etapa de PCR, compreendendo 82% dos *loci* pré-selecionados (tabela 1). Foi possível, também, observar sete *loci* com elevado grau de polimorfismo, a partir desses, foram realizadas as análises de variabilidade genética da população, obtendo os parâmetros descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados das análises de variabilidade genética intrapopulacional. Número de alelos observados por *locus* (A), heterozigosidade esperada (HE), heterozigosidade observada (HO), coeficiente de endogamia (Fis) e número de indivíduos (N). *Desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P<0,05).

	A	H _E	H _O	F _{IS}	N
Acom12.12	7	0,820	0,830	-0.0104	23
Acom78.4	7	0,770	0,500	0.3546	16
NgFos12	10	0,810	0,900	-0.1224	21
VgA04	8	0,740	0,520	0.2905	23
VgB06	6	0,610	0,260	0.5741	23
Vs10	16	0,880	0,650	0.2605	23
E6	11	0,850	0,740	0.1263	23

Os altos números de alelos observados indicam polimorfismo dentro da população de *Tillandsia alcatrazensis* da ilha. Os valores de heterozigosidade observada mostram alta a moderada diversidade genética para a espécie, variando entre 0,250 a 0,900, de maneira que a maioria dos *loci* possui um Ho entre 0,6 e 0,9. Os valores positivos de Fis, porém, em cinco dos sete *loci* indicam a ocorrência de homozigose maior do que a esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, resultado esse que pode sugerir a presença de alelos nulos ou a ocorrência de endogamia na espécie.

CONCLUSÕES:

Observando os resultados obtidos, entende-se um pouco mais da diversidade genética e de adaptação da espécie, bem como dinâmicas evolutivas estabelecidas dentro da população de *Tillandsia alcatrazensis*. Por

ser um recorte endêmico da ecologia vegetal da Ilha de Alcatrazes, esses dados ajudam na construção do panorama completo de composição e conservação da ilha. Demais projetos nesse tema podem usufruir dos dados aqui articulados para articular as relações entre outras espécies de *Tillandsias* filogeneticamente próximas, tanto encontradas no continente, quanto em ambientes insulares. O conjunto de *loci* otimizado para as ampliações ainda pode auxiliar na facilitação de demais pesquisas dentro do gênero.

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. aeranthos* (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
- 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
- SABINO, G.; LEODEGARIO, M.; MARCUSO, G.; SHIMIZU, G.; KOCH, I.; TAVARES, D. & PINHEIRO, F.. (2023). ***Tillandsia alcatrazensis* (Bromeliaceae), a new endemic species from Alcatrazes Island in southeastern Brazil**. Phytotaxa. 607. 213-221. 10.11646/phytotaxa.607.3.5.
- 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 Brasilica [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