



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

LIANA BULCÃO BITTENCOURT PETRARCA

**CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA PLASTIDIAL E DESENVOLVIMENTO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES (nSSR) EM *DYCKIA
BREVIFOLIA* BAKER, UMA BROMÉLIA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

FLORIANÓPOLIS

2024

LIANA BULCÃO BITTENCOURT PETRARCA

**CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA PLASTIDIAL E DESENVOLVIMENTO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES (nSSR) EM *DYCKIA
BREVIFOLIA* BAKER, UMA BROMÉLIA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon
Coorientador: Prof. Dr. Tiago Montagna

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.Dados inseridos pelo próprio autor.

Petrarca, Liana
CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA PLASTIDIAL E DESENVOLVIMENTO
DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES (nSSR) EM DYCKIA
BREVIFOLIA BAKER, UMA BROMÉLIA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO /
Liana Petrarca ; orientador, Valdir Stefenon,
coorientador, Tiago Montagna, 2024.
63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2024.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. marcadores
microssatélites. 3. genômica . I. Stefenon, Valdir. II.
Montagna, Tiago . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. IV. Título.

LIANA BULÇÃO BITTENCOURT PETRARCA
**CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA PLASTIDIAL E DESENVOLVIMENTO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES (nSSR) EM *DYCKIA
BREVIFOLIA* BAKER, UMA BROMÉLIA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 05/04/2024, pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof., Dr. Maurício Reis

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Yohan Fritsche

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Mestra em Ciências

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof., Dr. Valdir Marcos Stefenon
Orientador

Florianópolis, 2024

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha avó, Eva Lorena Chaves Petrarca (*in memoriam*) que sempre prezou tanto pela educação e ciência.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Valdir Stefenon por toda paciência, sabedoria compartilhada e conversas. Ao meu coorientador, Tiago Montagna, obrigada por todos ensinamentos e auxílios.

Aos excelentes Professores e Professoras do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelos ensinamentos, tanto os teóricos em disciplinas, quanto pelas conversas. Agradeço em especial, à Bernadete Ribas por todo suporte administrativo e carinho.

Ao meu companheiro de vida, Pedro Galhardi, obrigada por todo apoio em dias difíceis. Sem você a trajetória até aqui seria mais pesada.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da UFSC, principalmente à Joana Zeist, Danielle Silva, Suelen Guterres, Ana Kelly, Ingrid Brand, Dalvan Beise, Yohan Fritsche e Carolina Zanatta por toda ajuda, conhecimento compartilhado e tempo de descontração.

Aos meus pais, Humberto e Maria Luiza, obrigada por sempre acreditarem e vibrarem pelas minhas conquistas. Sou grata por todas conversas e conselhos da vida da minha irmã, Thais.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro oferecido pela CAPES e FAPESC que viabilizaram as atividades relativas a este trabalho.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DO GENOMA PLASTIDIAL E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NUCLEARES (nSSR) EM *DYCKIA BREVIFOLIA* BAKER, UMA BROMÉLIA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

Dyckia brevifolia Baker é uma bromélia endêmica com adaptações a ambientes extremos. Atualmente pode ser encontrada em áreas disjuntas numa extensão de 80 km ao longo do Rio Itajaí-Açu, em Santa Catarina. Encontra-se ameaçada de extinção como resultado das atividades humanas que ocorrem na Bacia deste rio para construção de uma usina hidrelétrica. Assim, levando em consideração a importância ecológica e ornamental de *D. brevifolia*, o alarmante estado de conservação da espécie e a interferência humana no local de ocorrência das populações, fazem-se necessários o conhecimento do genoma e desenvolvimento de marcadores moleculares para posterior estudos relacionados à diversidade genética das populações existentes, a fim de buscar estratégias de conservação da espécie. Assim, duas perguntas nortearam essa pesquisa: (1) quão conservado é o genoma plastidial de *D. brevifolia* em comparação com outras bromélias? (2) Qual o nível de diversidade genética identificado pelos marcadores microssatélites em populações naturais? O sequenciamento do genoma parcial da espécie foi realizado por meio do sistema Oxford Nanopore MiniON e a montagem do plastoma realizada pelo software CLC Genomics. Para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites nucleares foram selecionados *in silico* e com a validação na bancada, 9 marcadores SSR potencialmente polimórficos e informativos. A descrição do genoma plastidial completo de *D. brevifolia*, revelou a existência de semelhanças entre os plastomas de espécies da subfamília Pitcairnoideae, assim como Ananas. Os genes *ndhE* e *rpl22* podem estar relacionados à adaptação do habitat e ao crescimento e reprodução das plantas sob pressão de seleção. A árvore filogenética construída fornece suporte para entender a relação de *Dyckia* com *Puya*. Este estudo surge com importantes recursos para o aprimoramento de análises filogenômicas baseadas em genomas cloroplastidiais do gênero *Dyckia*, sendo a primeira espécie do gênero a ter o genoma plastidial completo montado e sequenciado. Embora seja possível a otimização da amplificação dos marcadores desenvolvidos no presente estudo, os *loci* SSR foram

capazes de amplificar o genoma de *D. brevifolia*, sendo úteis na análise de diversidade genética, conhecimento da variabilidade genética e conservação da espécie. As demes estudadas possuem diversidade genética baixa, mas similar à diversidade registrada em estudos anteriores com marcadores isoenzimáticos. Contudo, uma amostragem maior da espécie é necessária para determinar os fatores de diversidade genética das populações existentes. Em conclusão, os resultados deste estudo implicam em conhecimentos importantes nas áreas de genética, evolução e conservação de *Dyckia brevifolia* Baker. Os marcadores microssatélites e as sequências de cloroplastos que foram caracterizadas neste trabalho permitirão a realização de estudos que determinem o tamanho efetivo populacional, a diversidade genética existente e as relações filogenéticas entre populações e espécies do gênero *Dyckia*.

ABSTRACT

**CHARACTERIZATION OF THE PLASTID GENOME AND DEVELOPMENT OF
NUCLEAR MICROSATELLITE MARKERS (nSSR) IN *DYCKIA BREVIFOLIA*
BAKER, AN EXTINCTED BROMELIA**

Dyckia brevifolia Baker is an endemic bromeliad with adaptations to extreme environments. It can currently be found in separate areas extending 80 km along the Itajaí-Açu River, in Santa Catarina. It is threatened with extinction as a result of human activities taking place in the basin of this river to build a hydroelectric plant. Thus, taking into account the ecological and ornamental importance of *D. brevifolia*, the alarming state of conservation of the species and human interference in the place of occurrence of populations, knowledge of the genome and development of molecular markers for subsequent related studies are necessary. To the genetic diversity of existing populations, in order to seek conservation strategies for the species. Thus, two questions guide this research: (1) how conserved is the plastid genome of *D. brevifolia* compared to other bromeliads? (2) What is the level of genetic diversity identified by microsatellite markers in natural populations? The partial genome sequence of the species was carried out using the Oxford Nanopore MiniON system and the plastome assembly was carried out using the CLC Genomics software. For the development of nuclear microsatellite markers, they were selected *in silico* and with bench validation it was possible to prospect for 9 potentially polymorphic and informative SSR markers. The description of the complete plastid genome of *D. brevifolia* revealed the existence of similarities between the plastomes of species from the subfamily Pitcairnoideae, as well as *Ananas*. The *ndhE* and *rpl22* genes may be related to habitat adaptation and plant growth and reproduction under selection pressure. The constructed phylogenetic tree provides support for understanding the relationship of *Dyckia* with *Puya*. This study provides important resources for improving phylogenomic analyzes based on chloroplast genomes of the genus *Dyckia*, being the first species of the genus to have a complete plastid genome. Although it is possible to optimize the amplification of the markers developed in the present study, the SSR loci were capable of amplifying the *D. brevifolia* genome, being useful in the analysis of genetic diversity, knowledge of genetic variability and conservation of the species. The studied demes have low genetic diversity, but similar to the diversity recorded in previous studies with isoenzymatic markers. However, a larger sample of the species is necessary to determine the genetic diversity factors of existing populations. In conclusion, the results of this study imply important knowledge in the areas of genetics, evolution and conservation of *Dyckia brevifolia* Baker. The microsatellite markers and

chloroplast sequences that were characterized in this work will allow studies to be carried out to determine the effective population size, the existing genetic diversity and the phylogenetic relationships between populations and species of the genus *Dyckia*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 O gênero <i>Dyckia</i>	13
2.2 <i>Dyckia brevifolia</i> Baker	15
2.3 Marcadores moleculares microsatélites	17
2.4 O genoma plastidial de plantas	18
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 PERGUNTAS NORTEADORAS.....	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
Capítulo 1	26
Características Estruturais, Evolutivas e Filogenômicas do Genoma Plastidial de <i>Dyckia brevifolia</i> Baker	26
Introdução.....	27
Material e métodos.....	28
Sequenciamento e montagem do plastoma	28
Caracterização do genoma plastidial de <i>D. brevifolia</i> e relações filogenéticas com espécies da família Bromeliaceae.....	29
Resultados e discussão.....	31
Características gerais do plastoma de <i>D. brevifolia</i>	31
Análise comparativa entre os genomas de cloroplasto de espécies de Bromeliaceae	32
Conclusão	39
Referenciais.....	39
CAPÍTULO 2	43
Identificação e Desenvolvimento de Marcadores moleculares Microsatélites (SSR) para <i>Dyckia brevifolia</i> Baker	43
1. Introdução.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Coleta e extração de DNA	46

2.2	Sequenciamento do genoma total.....	47
2.3	Identificação de regiões microssatélites (SSR) e desenho de <i>primers</i>	47
2.4	Validação e caracterização dos marcadores microssatélites	47
2.5	Análise de dados	48
3.	Resultados e discussão.....	49
4.	Conclusão	56
5.	Referências.....	56
	Considerações Finais e Perspectivas	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Detalhes dos indivíduos pertencentes ao gênero *Dyckia* A) *Dyckia distachya*; B) *Dyckia brevifolia* e C) *Dyckia encholirioides*. Fonte: Coleção de Bromélias do CCA – UFSC.....16
- Figura 2.** Localização das populações identificadas de *Dyckia brevifolia* Baker, Rio Itajaí-Açu, SC. 1 Ressacada; 2. Subida/Apiúna I; 3. Subida/Ibirama I; 4. Subida/Apiúna II; 5. Subida/Apiúna III; 6. Subida/Ibirama II; 7. Morro Santa Cruz; 8. Ascurra; 9. Encano Baixo; 10. Encano; 11. Salto Waissbach I; 12. Salto Waissbach II. Fonte: Rogalski, 2007.17
- Capítulo 1**
Características Estruturais, Evolutivas e Filogenômicas do Genoma Plastidial de *Dyckia brevifolia* Baker
- Figura 1.** Mapa circular do genoma plastidial de *Dyckia brevifolia*. Genes de diferentes grupos funcionais estão coloridos diversamente. Genes dentro do círculo são transcritos em sentido anti-horário, e aqueles fora do círculo são transcritos em sentido horário. O círculo interno cinza escuro representa o conteúdo GC, e o cinza claro o conteúdo AT...34
- Figura 2.** Relação entre os genomas plastidiais de *Dyckia brevifolia* e espécies de Bromeliaceae. A análise de gráfico de pontos do genoma de *Dyckia brevifolia* contra três espécies de Bromeliaceae. A inclinação vermelha positiva significa que o par de sequências comparadas é na mesma orientação. A inclinação azul negativa denota que o par de sequências comparadas podem ser alinhadas, mas sua orientação é oposta. No gráfico de pontos em (D); (E) e (F) destacam lacunas e diferença de posição entre os genomas de *D. brevifolia*, *Puya ferruginea* (subfamília *Puyoideae*) e *Ananas comosus* (subfamília Bromelioideae) contra *Hetchia myriantha* (subfamília Hetchioideae).....35
- Figura 3.** Árvore filogenética de representantes de Bromeliaceae. os números em cima de cada ramificação representam os números de bootstrap.....36
- Figura 4.** Análise de janela deslizante. O eixo X representa a posição no genoma, enquanto o eixo Y representa os valores π correspondentes. O comprimento da janela foi definido para 400 pb com um tamanho de passo de 100pb. A linha pontilhada representa o ponto de corte considerado para determinação de regiões de alto polimorfismo ($20 \times$ o valor médio de diversidade π).....37
- Figura 5.** Alinhamento dos genomas plastidiais gerado pelo software Mauve para as espécies *Dyckia brevifolia*; *Puya ferruginea*; *Puya goudotiana*; *Puya hutchisonii*; *Puya macropoda*; *Puya macrura*; *Puya santosii*; *Puya raimondi*; *Puya nitida* e *Ananas comosus*.....39
- CAPÍTULO 2**
Identificação e Desenvolvimento de Marcadores molecular Microsatélites (SSR) para *Dyckia brevifolia* Baker
- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose de DNA de plantas de *Dyckia brevifolia* Baker.51
- Figura 2.** Exemplo de eletroferograma gerado para o locus MK263, utilizando a fluorescência 6-FAM.....52

Figura 3. Descritores da probabilidade de identidade de oito marcadores SSR polimórficos na amostra total de 29 indivíduos.....	57
Figura 4. Análise de coordenadas principais de 29 indivíduos de <i>Dyckia brevifolia</i> adultos de 3 demes do Rio Itajaí-Açu, Salto Waissbach, baseados em genótipos obtidos com nove marcadores microssatélite desenvolvidos neste estudo.....	58

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Características Estruturais, Evolutivas e Filogenômicas do Genoma Plastidial de *Dyckia brevifolia* Baker

Tabela 1. Genomas de referência usados na análise comparativa de plastomas de <i>Dyckia brevifolia</i>	48
Tabela 2. Predição de genes e valores de sítios editados no plastoma de <i>Dyckia brevifolia</i> Baker, utilizando <i>C. nucifera</i> , <i>O. sativa</i> e <i>Z. mays</i> como referências. Cada (+) indica a presença de edição em uma das espécies referência.....	57

CAPÍTULO 2

Identificação e Desenvolvimento de Marcadores molecular Microssatélites (SSR) para *Dyckia brevifolia* Baker

Tabela 1. Descrição dos 9 loci microssatélite de <i>Dyckia brevifolia</i> Baker, incluindo as sequências dos primers (F- <i>foward</i>) e (R- <i>reverse</i>), temperatura de anelamento, tamanho alélico esperado de cada locus, motivo de repetição da região microssatélite e cromossomo no qual foi encontrada essa região no genoma de <i>Ananas comosus</i> na etapa de caracterização dos marcadores.....	48
Tabela 2. Estimativa de diversidade genética dos 9 loci SSR em 3 demes de <i>D. brevifolia</i>	57

1. INTRODUÇÃO

Bromeliaceae é uma família neotropical, composta por 78 gêneros e 3791 espécies conhecidas (Gouda e Butcher, 2024). Ocupa a posição basal na ordem Poales juntamente com Typhaceae e Rapateaceae e é organizada em oito subfamílias: Bromelioideae, Tillandsioideae, Pitcairnioideae, Navioideae, Puyoideae, Brocchinioideae, Hechtioideae e Lindmanioideae (Givnish *et al.*, 2011)

Adaptações funcionais e ecológicas permitiram que as bromélias ocupassem uma gama de habitats extremos, desde o norte da Patagônia até o Sul dos Estados Unidos (Christenhusz & Chase, 2013). Se destacam pela capacidade de armazenamento de água, sendo esta característica resultado da distribuição espiralada de suas folhas, que formam pequenos tanques e na rapidez na absorção de nutrientes. Tais características possibilitaram a vida em ambientes diversos e extremos, como habitats rupícolas, que vivem sobre rochedos, epífitos, que vivem sobre outras plantas sem que ocorra o parasitismo e aéreos, capazes de crescer longe da terra ou em cima de outras superfícies, sem prejudicá-las, onde o aspecto principal é a restrição hídrica (Martinelli *et al.*, 2008). Espécies desta família são bons modelos para o entendimento de como a interação entre processos microevolutivos, como fluxo gênico e seleção natural, influenciam nas taxas de especiação e extinção em nível de espécie nos Neotrópicos.

No Brasil, são encontrados 44 gêneros e aproximadamente 1700 espécies. Destas, mais de 60% são consideradas endêmicas (BFG, 2018) e muitos destes táxons são encontrados exclusivamente na Mata Atlântica. Três subfamílias ganham destaque na região brasileira, especialmente na Mata Atlântica, sendo elas: Tillandsioideae, Bromelioideae e Pitcairnioideae (Oliveira, 2018). Esta última é caracterizada por margem foliar espinescente, ovário súpero ou semi-ínfero, fruto tipo cápsula e sementes aladas (Smith; Downs 1974)

Dyckia Schult. & Schult.f. é um gênero que inclui 181 espécies (Gouda et al., 2024.) (plantas perenes terrestres ou saxícolas), apresenta espécies reófitas, que são espécies vegetais confinadas ao leito de rios e riachos, crescendo acima do nível das inundações, mas não além do alcance da ocorrência regular das rápidas enchentes e é um dos gêneros mais ricos em espécies da subfamília Pitcairnioideae (Krapp *et al.* 2014; Antar *et al.* 2021). Este gênero inclui espécies nativas e que prosperam em ambientes com solo pobre, suprimento limitado de água, e alta exposição à luz solar. As espécies deste gênero podem ser encontradas como indivíduos únicos, formados por dispersão de sementes ou densos aglomerados formados por propagação clonal (Leme et al. 2012).

Espécies desse gênero podem ser encontradas na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Givnish et al., 2007). No Brasil, ocorrem um total de 164 espécies aceitas (Buneker et al., 2020)

Dyckia brevifolia Baker é uma heliófita que tolera pleno sol, mas também pode se adaptar ao fluxo de um rio, seja essa adaptação sua submersão durante as cheias e/ou sua desidratação durante os períodos de seca (Santos-Silva et al. 2013). Além disso, seus aspectos morfoanatômicos carregam características tanto xeromórficas quanto hidromórficas que, em um ambiente reofítico, dão origem a adaptações durante períodos de cheia e seca (Lobo et al. 2013).

Atualmente, *D. brevifolia* pode ser encontrada em áreas disjuntas na extensão de 80 km ao longo do Rio Itajaí-Açu, estando em estado crítico para extinção como resultado das atividades humanas que ocorrem na Bacia deste rio para construção de uma usina hidrelétrica (Rogalski et al. 2017). Além do seu potencial ornamental, há significativa importância ecológica, à medida que fornece grande variedade de recursos para outros organismos, como água, abrigo e alimento (Islair et al. 2015).

Considerada “Em perigo” (EN) pela Lista de Espécies Ameaçadas do Rio Grande do Sul (CONSEMA-RS, 2002). A redução dos micro-habitats específicos da espécie, principalmente devido à implantação de hidrelétricas, implica na redução proporcional da espécie (Rogalski, 2007).

Na tentativa de reduzir problemas relacionados à extinção de espécies, estudos a respeito da diversidade genética das espécies a serem preservadas e o conhecimento de suas sequências genômicas é um importante elemento para justificar ações de conservação. Além disso, o conhecimento da variação genético do plastoma dentro e entre populações fornece informações importantes que podem ser usadas para conservar espécies e populações, auxiliando a se adaptarem às mudanças climáticas e de habitat (Daniell et al., 2016).

Além disso, marcadores microssatélites são importantes ferramentas biotecnológicas para estudos de diversidade genética por serem altamente polimórficos e informativos (Faleiro, 2007). Avanços nas variedades de marcadores e técnicas moleculares geraram diminuição no seu custo, ao mesmo tempo, o conhecimento e abrangência de análises que podem ser feitas cresceram. Dessa forma, tem se

desenvolvido marcadores microssatélites para diversas espécies nativas da Mata Atlântica, como a pitangueira (Sarzi et al. 2019), a aroreira-periquita (Lemos et al. 2018), a guabiroba (Petri et al. 2019) e uma espécie de bromélia, a *Vriesea carinata* Wawra (Todeschini, 2016).

Os genomas de cloroplasto possuem processos evolutivos mais lentos e ocorrem em taxas distintas das regiões nucleares e apresentam reduzido tamanho, com presença de regiões altamente conservadas intercaladas a regiões com elevadas taxas evolutivas (Daniell et al., 2016). As mutações são menos frequentes neste genoma, as mudanças geralmente ocorrem devido a alterações como deleções e inserções de sequências de DNA e perda de regiões invertidas (Xiao-Ming et al., 2017). Por esses motivos, os estudos desenvolvidos com genomas cloroplastidiais têm sido amplamente utilizados com o intuito de conhecer a origem, as relações entre as espécies e evolução, como nos trabalhos de sequenciamento do genoma cloroplastidial de arroz (Wambugu et al., 2015), de bambu (Zappellini, 2022) e *Plinia* (Machado et al, 2021).

Levando em consideração a importância ecológica e ornamental de *D. brevifolia*, seu estado de conservação da espécie e a interferência humana no local de ocorrência das populações, fazem-se necessários desenvolvimento de marcadores moleculares para posterior estudos relacionados à diversidade genética das populações existentes, a fim de buscar estratégias de conservação da espécie. Devido a seu alto nível de polimorfismo e análise direta das sequências do DNA e marcadores moleculares microssatélites poderão gerar uma importante contribuição para a caracterização genética das subpopulações de *D. brevifolia*.

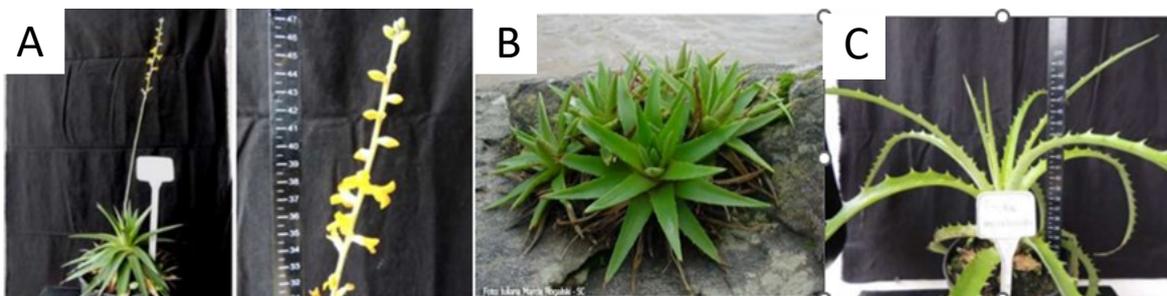
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Dyckia*

Espécies do gênero são caracterizadas por folhas coriáceas e suculentas, espinhos bem desenvolvidos ao longo das margens das folhas e inflorescência lateral racemosa,

além de não apresentarem tanque. O perianto pode ser amarelo, laranja ou avermelhado, os frutos são cápsulas que liberam sementes aladas e anemocóricas (Leme et al. 1993).

Figura 1. Detalhes dos indivíduos pertencentes ao gênero *Dyckia* A) *Dyckia distachya*; B) *Dyckia brevifolia* e C) *Dyckia encholirioides*. Fonte: Coleção de Bromélias do CCA – UFSC



Krapp e colaboradores (2014) desenvolveram o primeiro estudo acerca de análises filogenéticas de *Dyckia* e gêneros relacionados, com base em seis regiões de DNA plastidial e sequências nucleares. Foi demonstrada a riqueza de espécies de *Dyckia* comparada com seus parentes mais próximos como o gênero *Encholirium* (27 espécies) e *Deuterocohnia* (17 espécies) formando um grupo xérico. Quanto à distribuição, *Dyckia* é enquadrada como monofilético surgindo de *Encholirium*, mas o fato de apresentar um grupo maior não foi resolvido. Além disso, nesse mesmo estudo, foi constatado que para inferir os limites das espécies seria necessário a utilização de marcadores mais sensíveis, como os microssatélites (SSR).

Estudos mais recentes a respeito da filogenia de *Dyckia*, com ampla amostragem morfológica, biogeográfica e molecular também corroboram a monofilia do clado xérico, como um único grupo (Pinangé et al., 2016; Schutz et al., 2016; Gomes-da-Silva et al., 2019). Mostrando que os três gêneros do clado xérico não são sustentados como monofiléticos, apoiando a combinação de todas as espécies de *Encholirium* e *Deuterocohnia* em *Dyckia* e o reconhecimento apenas deste gênero no clado. Concluindo que a classificação mais correta é aquela que reflete a história evolutiva do grupo e não há mérito em adotar táxons parafiléticos e polifiléticos, sendo apenas grupos monofiléticos formalmente nomeados, pois refletem os resultados dos processos evolutivos (Gomes-da-Silva et al., 2019).

Entre as 164 espécies encontradas no Brasil, 154 espécies são endêmicas (Buneker et al., 2020). Essas distribuições restritas colocam a maioria dessas espécies em algum nível de ameaça, como evidenciado para *Dyckia distachya* (Pompelli; Guerra, 2004), *Dyckia pseudococcinea* (Mendes et al., 2010), *Dyckia excelsa* (Ruas et al., 2020) e *Dyckia ibiramensis* (Rogalski et al., 2021).

2.2 *Dyckia brevifolia* Baker

Considerada uma espécie rara e endêmica, se dividindo em apenas doze agrupamentos, de tamanhos distintos, nas margens do Rio Itajaí-Açu, desde a cidade de Lontras, indo em direção à cidade de Blumenau, no Estado de Santa Catarina, Brasil (Rogalski e Reis, 2009), ocupando ao longo de 80 km do rio, uma área menor que dois hectares (Fig. 2). Se caracteriza pela ocupação de micro-habitat, com escassez de nutrientes, intensa luminosidade e inundações periódicas (Rogalski, 2007). Como reófito, possui alta seletividade e adaptação a ambientes adversos e variáveis.

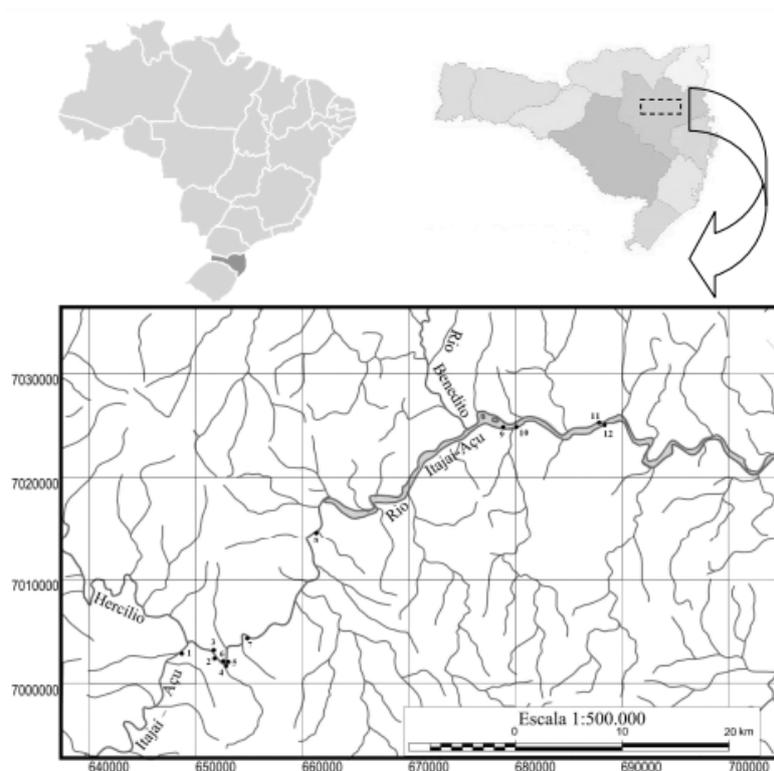


Figura 2. Localização das populações identificadas de *Dyckia brevifolia* Baker, Rio Itajaí-Açu, SC. 1 Ressacada; 2. Subida/Apiúna I; 3. Subida/Ibirama I; 4. Subida/Apiúna

II; 5. Subida/Apiúna III; 6. Subida/Ibirama II; 7. Morro Santa Cruz; 8. Ascurra; 9. Encano Baixo; 10. Encano; 11. Salto Waissbach I; 12. Salto Waissbach II. Fonte: Rogalski, 2007

Segundo Rogalski (2007), a bromélia *D. brevifolia* apresenta propagação clonal, um fator que contribui para sua persistência. Além de apresentar iteropariedade (a mesma roseta floresce várias vezes), é autocompatível e a agamospermia pode ocorrer. A partir de estudos sobre o fluxo gênico das populações de *D. brevifolia*, foi apresentado que a espécie é influenciada pelo fluxo unidirecional do rio, tendo maior diversidade nas populações a jusante (Rogalski et al., 2017)

Rogalski e colaboradores avaliaram as mesmas populações de *D. brevifolia* em um segundo estudo, confirmando que as populações da espécie apresentaram distribuição disjunta e nas 12 populações estudadas sua área de ocupação foi de 9.185m², ou seja, menos de um hectare (Rogalski et al. 2022)

Alguns estudos envolvendo germinação e propagação *in vitro* de *D. brevifolia* foram efetivos com pequena quantidade de material vegetal (Bertsouklis et al. 2022) indicando uma alternativa para propagação desta espécie.

A espécie *Dyckia brevifolia* vem sofrendo consequências devido a fatores antrópicos, sendo considerada “ criticamente em perigo ” pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente de Santa Catarina (CONSEMA, 2015) e sendo considerada “ Deficiente de Dados ” pelo Ministério do Meio Ambiente. Com a instalação da Hidrelétrica Salto Pilão ameaça o desenvolvimento e a conservação da espécie, pois as mesmas formam lagos que inundam populações e os trechos de vazão reduzida provocam alteração no nível de água, modificando o ambiente no qual a espécie ocorre.

Os marcadores microssatélites são importantes ferramentas para o estudos de determinação da diversidade genética existente, tamanho efetivo populacional, taxas de fluxo gênico sendo utilizado na biologia da conservação da espécie. Além disso, as sequências cloroplastídias ajudam a determinar com mais clareza as relações filogenéticas entre *Dyckia brevifolia* com as demais espécies próximas. Assim, existe a necessidade de gerar essas informações utilizando estratégias de genômica estrutural e funcional, contribuindo para o desenvolvimento de ferramentas moleculares como marcadores SSR nucleares e plastidiais, além da caracterização da composição geral de seu genoma, auxiliando em estudos sobre evolução e adaptação da espécie.

2.3 Marcadores moleculares microssatélites

Com o uso de métodos biotecnológicos é possível se ter compreensão mais rápida e profunda da diversidade genética de espécies e dos mecanismos responsáveis por essa variação na natureza, assim como a importância dessa variação para a adaptação das plantas ao seu ambiente (Callow *et al.*, 1997). Ademais, a evolução dessas técnicas promove estratégias de conservação mais efetivas ao facilitar a definição da dimensão de diversidade genética de uma espécie, auxiliando na tomada de decisão sobre o manejo de recursos vegetais para que seja mais esclarecida e consciente (Barrandeguy; Garcia, 2016).

A prospecção e o uso de marcadores moleculares para detectar e estudar os polimorfismos de DNA foram grandes avanços para a genética molecular, uma vez que a utilização de marcadores localizados no DNA fornece uma grande gama de informações sobre o genoma (Turchetto-Zolet *et al.* 2017). Assim, os marcadores moleculares são altamente valorizados e utilizados em áreas da genética e biologia molecular e se tornaram componentes fundamentais de maior parte dos estudos da distribuição de diversidade genética e da análise dos fatores que afetam essa diversidade.

Diferentes estudos, usam diferentes técnicas moleculares, como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter-simple sequence repeats), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) e SSR (Simple Sequence Repeats). Cada um desses marcadores moleculares tem propriedades diferentes, refletindo diferentes aspectos da diversidade genética e possuem suas vantagens e limitações (Rao & Hodgkin, 2002). Assim, a escolha do marcador depende das questões a serem abordadas, dos organismos alvo do experimento, da quantidade de DNA disponível, das questões monetárias e das condições do laboratório (Hodgkin *et al.*, 2001)

No genoma dos seres vivos, há presença de várias sequências simples repetidas, que derivam de um a seis nucleotídeos em continuidade nos genomas eucariotos. Essas regiões são denominadas de microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat). Os SSRs são em maior número em regiões não codificantes do genoma nuclear, também sendo

encontrados em alguns genomas organelares e cada microssatélite constitui um locus genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (Caixeta *et al.*, 2016).

Os marcadores SSRs são obtidos com o uso de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para essas sequências adjacentes ao SSR, e por meio da PCR é possível amplificar um determinado loco e identificar os polimorfismos individuais relacionados ao número de repetição do SSR para aquele indivíduo (Oliveira *et al.*, 2021)

Por serem codominantes, os microssatélites possibilitam a distinção entre indivíduos heterozigotos e homozigotos, tornando-os úteis em estudos de diversidade genética (Caixeta *et al.*, 2016). Além de apresentarem distribuição aleatória e abundante, apresentam um alto nível de diversidade alélica, possibilitando a análise de polimorfismo entre populações e indivíduos. Os dados de diversidade genética gerados por esses marcadores possibilitam mapeamento de genomas, identificação e caracterização de genes, identificação e estimativa de parentesco entre indivíduos, conservação, entre outras ferramentas importantes (Mohan *et al.*, 1997). Segundo Zanella *et al.* (2012), os SSRs demonstram valores mais realistas das heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em bromélias do que os demais marcadores. De modo geral, os SSRs são os marcadores mais utilizados para a genotipagem de plantas nos últimos 20 anos, sendo mais informativos do que outras classes de marcadores (Azevedo *et al.*, 2019).

Para análise dos principais parâmetros de diversidade genética, como número médio de alelos por loco, riqueza alélica, heterozigosidade observada e esperada são calculados a partir da matriz dos genótipos de SSR. Levando em consideração as estimativas das frequências alélicas, utilizando programas que foram desenvolvidos para estimar esses índices, como por exemplo: GENEPOP, GENALEX, FSTAT, entre outros (Excoffier & Heckel, 2006)

2.4 O genoma plastidial de plantas

O genoma de cloroplasto constitui uma importante organela que atua como centro metabólico para biossíntese de compostos essenciais para a fisiologia e desenvolvimento de plantas (Daniell *et al.* 2016). Também conhecido por cpDNA, plastoma ou plastídeo, é uma das principais características distintivas das células vegetais de outras eucarióticas, cujos diferentes tipos (protoplastos, amiloplastos, cromoplastos, cloroplastos) apresentam funções metabólicas específicas essenciais para a viabilidade celular (Rogalski *et al.*

2015). A função central dos cloroplastos é a realização da fotossíntese, processo de fixação de CO₂ em carboidratos elaborados por mecanismos fotoquímicos, e com liberação de oxigênio atmosférico (Green 2011).

Comparado ao genoma nuclear, o genoma plastidial apresenta algumas vantagens em análises evolutivas moleculares e sistemáticas: o genoma cloroplastidial é pequeno e haplóide, facilitando sua obtenção; os genes do plastoma são relativamente conservados em sequência e bem caracterizados em função e as taxas de mutações são lentas (Fu et al., 2022).

O DNA do cloroplasto (cpDNA) é o ácido nucleico mais amplamente utilizado na filogenia de plantas, pois oferece diversas vantagens para a sistemática. O cpDNA é composto por uma cápsula extranuclear e contém informações genéticas que são codificadas nas proteínas enzimáticas e estruturais. Essa organela sofreu especiação e as sequências nucleotídicas de seu DNA podem ser consideradas conservadas e importantes fontes de evidência sobre as relações evolutivas entre taxas fotossintéticas (DHINGRA; FOLTA, 2005).

O genoma plastidial é dividido em quatro regiões: região longa de cópia única (LSC), região curta de cópia única (SSC) e duas regiões repetidas invertidas (IR) (Yukawa et al. 2005). As duas IRs são idênticas na composição, com duas cópias por genoma, porém em sentido contrário.

O sequenciamento de nova geração (NGS) tem permitido muitos avanços nos estudos de genômica estrutural e funcional. O sequenciamento do genoma plastidial pode ser considerado uma importante fonte de dados que permite realizar diversas análises comparativas relacionadas com estudos baseados em filogenia e evolução de plantas. Por exemplo, Carbonell-Caballero et al. (2015) analisaram 34 plastomas de espécies de *Citrus* e elucidaram a diversidade, relação filogenética e processos evolutivos do gênero. Li et al. (2021) reuniram mais de 4.000 sequências plastidias e forneceram a árvore mais abrangente para angiospermas. Além disso, o genoma plastidial também foi usado como *barcoding* para discriminação de espécies em gêneros filogeneticamente e taxonomicamente complexos, como *Dracaena*, *Panax* e *Rhododendron* (Lee et al., 2017; Nguyen et al., 2017; Ji et al., 2019)

As sequências de cpDNAs também servem como excelentes fontes de dados para estudar eventos de transferência horizontal de genes e rearranjos ocorridos nestes

compartimentos genéticos durante o processo de evolução da célula vegetal (Lin et al. 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver marcadores microssatélites nucleares, plastidiais e mitocondriais a partir do genoma de *Dyckia brevifolia*, visando fornecer ferramentas para o estudo e conservação da espécie.

3.2 Objetivos específicos

- Prospectar e caracterizar marcadores microssatélites no genoma total de *Dyckia brevifolia*;
- Validar os marcadores microssatélites nucleares desenvolvidos em *D. brevifolia*;
- Sequenciar, montar e anotar o genoma plastidial de *D. brevifolia*

4 PERGUNTAS NORTEADORAS

Quão conservado é o genoma plastidial de *Dyckia brevifolia* em comparação com outras bromélias?

Qual o nível de diversidade genética identificado pelos marcadores microssatélites em populações naturais?

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTAR G. M. FARIA, J. E. Q., ROSA, P. O., SOARES, A. C. A., & FORZZA, R. C. Novelty in *Dyckia* (Pitcairnioideae - Bromeliaceae) from the South America dry diagonal: Two new species, a new combination and a new name. **Feddes Repertorium**, 132(3), 269–278. 2021.

AZÊVEDO, H. S. F. S. et al. transferability of heterologous microsatellite loci between species of *Euterpe* genus. **Genetics and molecular research**, v. 16, n. 4, p. 17, 2017.

BARRANDEGUY, M.E.; GARCIA, M.V. Microsatellites as a tool for the study of microevolutionary process in native forest trees. Microsatellite markers. **In TechOpen**, 2016. 27p. DOI: 10.5772/65042.

BERTSOUKLIS, K.; PANAGAKI, K.-P. In Vitro Germination and Propagation of *Dyckia brevifolia*, An Ornamental and Endangered Bromeliad. **Horticulturae** **2022**, *8*, 390. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050390>

BFG. 2018. Brazilian Flora: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia** **69** (4): 1513- 1527. BRASIL. 2020

BÜNEKER HM, GUARÇONI EAE, SANTOS-SILVA F, FORZZA RC. 2020. *Dyckia* In: Flora do Brasil. 2020. Rio de Janeiro, **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6046>

CAIXETA, E.T., BORÉM, A. **Marcadores moleculares**. 22. ed. Viçosa: UFV, 2016. 385p

CALLOW, J. A., FORD-LLOYD, B. V., NEWBURY, H. J. **Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Uses**. CAB International, 1997.

CAO, Y., TUNG, W. W., GAO, J. B., Qi, Y. Recurrence time statistics: versatile tools for genomic DNA sequence analysis. **J Bioinform Comput Biol** **3**(3):677-96. 2005

CARBONELL-CABALLERO J, ALONSO R, IBANEZ V, TEROL J, TALON M, DOPAZO J. 2015. A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus *Citrus*. **Molecular Biology and Evolution** **32**: 2015–2035.

CHRISTENHUSZ M. J. M., CHASE M. W. Biogeographical patterns of plants in the Neotropics – dispersal rather than plate tectonics is most explanatory. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 2013. **171**: 277–286.

CONSEMA (Conselho Estadual de Meio Ambiente de Santa Catarina). 2014. Resolução Consema nº 51, de 05 de dezembro de 2014. *Reconhece a Lista Oficial das Espécies da Flora Ameaçada de Extinção no Estado de Santa Catarina e dá outras providências. Diário Oficial da União.*

Daniell, H. et al. Chloroplast genomes: Diversity, evolution, and applications in genetic engineering. **Genome Biology BioMed Central Ltd**. 2016.

DHINGRA, A.; FOLTA, K.M. ASAP: Amplification, sequencing ; annotation of plastomes. **BMC Genomics**. **6**:176.2005

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L., Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus (Madison)**. **12**, 13–15. 1990.

EXCOFFIER, L., HECKEL, G. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. **Nat Rev Genet** **7**: 745-758. 2006.

FU CN, MO ZQ, YANG JB, CAI J, YE LJ, ZOU JY, QIN HT, ZHENG W, HOLLINGSWORTH PM, LI DZ, GAO LM. 2022. Testing genome skimming for species

discrimination in the large and taxonomically difficult genus *Rhododendron*. **Molecular Ecology Resources** 22: 404–414.

GIVNISH TJ, MILLAM KC, BERRY PE, SYSTMA KJ. 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. **Aliso** 23: 3-26.

GIVNISH, T.J., BARFUSS, M. H. J., VANE, R., RIINA, K. SCHULTE, K., HORRES, R., GONSISKA, P.A., JABAILY, R.S., CRAYN, D.M., SMITH, J.A.C, WINTER, K., BROWN, G.K., EVANS, T.M., HOLST, B.K., LUTHER, H. TILL, W., ZIZKA, G., BERRY, P.E. and SYSTMA, K.J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, 98: 872-895. 2011

GOMES-DA-SILVA, J. SANTOS-SILVA, F. & FORZA, R. C. Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae), **Systematics and Biodiversity**, 17:5, 467-490. 2019

GOMES-DA-SILVA, J., AMORIM, A. M. & FORZZA, R. C. Species distribution of the xeric clade of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) in South America: a perspective based on areas of endemism. **Journal of Biogeography**. 44: 1994-2006. 2017

GOUDA, E.J., BUTCHER, D. & DIJKGRAAF, L. (cont.updated) *Encyclopaedia of Bromeliads, Version 5*. UTRECHT UNIVERSITY BOTANIC GARDENS, online <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>

HODGKIN, T.; ROVIGLIO, R.VICENTE, M.C.; DUDNIK, N. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. **Acta Horticulturae**, v. 546, p. 107–118, 2001.

JI Y, LIU C, YANG Z, YANG L, HE Z, WANG H, YANG J, YI T. 2019. Testing and using complete plastomes and ribosomal DNA sequences as the next generation DNA barcodes in *Panax* (Araliaceae). **Molecular Ecology Resources** 19: 1333–1345.

KRAPP, F., PINANGÉ, D. S. B. BENKO-ISEPPON, A. M., LEME, M. C. E.; WEISING, K. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Syst Evol**. 300: 1591-1614. jan. 2014.

LEE HJ, KOO HJ, LEE J, LEE S-C, LEE DY, GIANG VNL, KIM M, SHIM H, PARK JY, YOO K-O, SUNG SH, YANG T-J. 2017. Authentication of *Zanthoxylum* species based on integrated analysis of complete chloroplast genome sequences and metabolite profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 65: 10350–10359.

LEME, E., M., C., RIBEIRO, O., B. C., MIRANDA, Z., J., G. New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 67, n. 1, p. 9-37. 2012.

LI HT, LUO Y, GAN L, MA PF, GAO LM, YANG JB, CAI J, GITZENDANNER MA, FRITSCH PW, ZHANG T, JIN JJ, ZENG CX, WANG H, YU WB, ZHANG R, VAN DER BANK M, OLMSTEAD RG, HOLLINGSWORTH PM, CHASE MW, SOLTIS

DE, SOLTIS PS, YI TS, LI DZ. 2021. Plastid phylogenomic insights into relationships of all flowering plant families. **BMC Biology** 19: 232.

LIN, C.P.; HUANG, J.P.; WU, C.S.; HSU, C.Y.; CHAW, S.M. 2010. Comparative chloroplast genomics reveals the evolution of Pinaceae genera and subfamilies. **Genome Biol. Evol.** 2:504-517. 2010

MACHADO, L. DE O., STEFENON, V. M., VIEIRA, L. DO N., & NODARI, R. O.. (2022). Structural and evolutive features of the *Plinia phitrantha* and *P. cauliflora* plastid genomes and evolutionary relationships within tribe Myrteae (Myrtaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 45(1), e20210193. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0193>

MARTINELLI, G. VIEIRA, M.C., GONZALEZ, M., LEITMAN, P., PIRATININGA, A., DA COSTA, F.A., FORZZA, C.R. Bromeliaceae of the brazilian Atlantic Forest: checklist, distribution and conservation. **Rodriguésia** 59 (1): 209-258. 2008

MENDES SIMONE P., COSTA CECÍLIA G., DE TONI KAREN L. G. (2010) Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. **Australian Journal of Botany** 58, 485-492. <https://doi.org/10.1071/BT10073>

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R.; SASAKI, T. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 87–103, 1997.

Nguyen VB, Park H-S, Lee S-C, Lee J, Park JY, Yang T-J. 2017. Authentication markers for five major *Panax* species developed via comparative analysis of complete chloroplast genome sequences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 65: 6298–6306.

OLIVEIRA, A. J.; OLIVEIRA, T. C. de .; SANTOS, A. A. C. dos; SIQUEIRA, T. A.; DUARTE, W. M. .; CALDEIRA, D. S. A.; VILARINHO, M. K. C.; ALMICI, M. da S.; SILVA, G. F. da . .; BARELLI, M. A. A. .; KARSBURG, I. V. . Principal molecular markers. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 15, p. e562101523633, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i15.23633.

OLIVEIRA, F. M. C. et al., Morphoanatomical Characters In The Nidularioid Complex (Bromeliaceae: Bromelioidae) From A Phylogenetic Perspective. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology Of Plants*, 239: 111–121, 2018.

PINANGÉ DSB, KRAPP F, ZIZKA G, SILVESTRO D, LEME EMC, WEISING K, BENKO-ISEPPON AM. 2016. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 183: 39-56.

POMPELLI, M. P.; GUERRA, M. P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 4:273-279, 2004.

RAO, V. R.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 68, p. 1–19, 2002.

ROGALSKI, J. M. & REIS, A. Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. v. 5, p. 3, 2009.

ROGALSKI, J. M. **Conservação de reófitas: o caso da bromélia *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), Rio Itajaí-Açu, SC**. Tese (Doutorado, Recursos Genéticos Vegetais), Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

ROGALSKI, J. M. et al. Mating System and Genetic Structure Across All Known Populations of *Dyckia brevifolia*: A Clonal, Endemic, and Endangered Rheophyte Bromeliad. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 3, p. 299–307, abr. 2017.

ROGALSKI, J. M., BERKENBROCK, I. S., VIEIRA, N. K., & REIS, A.. (2021). Demographic structure of clonal, endemic, and endangered rheophyte bromeliad *Dyckia ibiramensis*: asexual vs sexual reproduction. *Rodriguésia*, 72, e00752020. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202172116>

ROGALSKI, J., M.; REIS, M. S.; REIS, A. et al. Demographic structure across all known populations of the rheophyte *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae) in the Itajaí-Açu River, Southern Brazil. 04 November 2022, PREPRINT [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2213650/v1>]

RUAS, R. DE BARROS, PAGGI, G.; AGUIAR-MELO, C.,HIRSCH,L. D.; BERED, F. Strong genetic structure in *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae), an endangered species found on ironstone outcrops in Pantanal, Brazil, **Botanical Journal of the Linnean Society**, Volume 192, Issue 4, April 2020, Pages 691–705, <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boz099>

SCHÜTZ N, KRAPP F, WAGNER N, WEISING K. 2016. Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. **Botanical Journal of the Linnean Society** 181: 323-342.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Pitcairnoideae. (Bromeliaceae). Neotropica Monograph. **The New York Botanical Garden**, New York. 14 (1): 1-6662. 1974.

TODESCHINI, CRISTINA C. **Isolamento, caracterização e transferência de marcadores microssatélites para *Vriesea carinata* Wawra (Bromeliaceae) desenvolvidos in silico**. Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação (30758). 2016. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Curso de Ciências Biológicas: Bacharelado.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M.; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: **Editora SBG Sociedade Brasileira de Genética**. 2017.

UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J. FAIRCLOTH, B. C., REMM, M., ROZEN, G. S. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, issue 15, 2012.

XIAO-MING, Z. ET AL. Inferring the evolutionary mechanism of the chloroplast genome size by comparing whole-chloroplast genome sequences in seed plants. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2017.

YUKAWA, M.; TSUDZUKI, T.; SUGIURA, M. The 2005 Version of the Chloroplast DNA Sequence from Tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Plant Mol. Biol. Rep.** 23:359–365. 2005.

ZANELLA, C. M.; JANKE, A.; PAGGI, G.M.; GOETZE, M.; REIS, M.S.; BERED, F. Microsatellites in the Endangered Species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and Cross-Amplification in Other Bromeliads. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 15859–15866, 2012.

ZAPPELINI, JULIA. **Evolução molecular em Bambusoideae Luer. (Poaceae Barnhart): taxonomia molecular e caracterização de genoma plastidial de espécies nativas.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2022.

Capítulo 1

Características Estruturais, Evolutivas e Filogenômicas do Genoma Plastidial de *Dyckia brevifolia* Baker

Resumo

Nos últimos anos as sequências de DNA plastidial forneceram informações importantes sobre ecologia e evolução das plantas, esse contínuo uso de sequenciamento de plastídios se deve, principalmente, por ser um genoma mais acessível para a biologia molecular. *Dyckia brevifolia* Baker é uma espécie da família Bromeliaceae endêmica do Sul do Brasil. A espécie *D. brevifolia* é uma reófito e está restrita às regiões rochosas às margens do rio Itajaí-Açu, em Santa Catarina. Estudos de filogenia da subfamília Pitcairnioideae, à qual pertence o gênero *Dyckia*, baseados em genes plastidiais têm sido realizados com o objetivo de entender as relações evolutivas desse grupo de plantas. Considerando a escassez de estudos genômicos disponíveis para a espécie e seu gênero e com objetivo de fornecer novos recursos genômicos para *Dyckia brevifolia* Baker, o presente estudo objetivou realizar uma análise evolutiva comparativa dos cpDNAs entre *D. brevifolia* e outras espécies de bromélias usando conjuntos de dados genômicos publicamente disponíveis. Foi realizado o sequenciamento, montagem e caracterização do plastoma completo da espécie. Além disso, sítios de edição de RNAs foram preditos. Foi realizada uma análise filogenômica usando as sequências completas dos plastomas de *D. brevifolia* e mais 9 espécies da família Bromeliaceae. A sequência do genoma plastidial de *Tillandsia cyanea* foi usada como grupo externo. Além disso, espécies do gênero *Hechtia* (Bromeliaceae) foram utilizadas nas análises a fim de comparação entre representantes das bromélias. O genoma plastidial completo de *D. brevifolia* revelou a existência de semelhanças entre os plastomas de espécies da subfamília Puyoideae, assim como *Ananas*. Os genes *ndhE* e *rpl22* podem estar relacionados à adaptação do habitat, ao crescimento e reprodução das plantas sob pressão de seleção. A árvore filogenética construída fornece suporte para entender a relação de *Dyckia* com *Puya*.

Introdução

Em angiospermas os genomas cloroplastidiais (aqui definidos como plastomas ou cpDNA) podem existir em formas circulares variando de 120 a 160KB de comprimento (Greiner et al., 2014). Na sua maioria, os plastomas têm organização quadripartida, com duas cópias de Repetições Invertidas (IRs) separando o restante do genoma em uma região de cópia única grande (LSC) e uma de cópia pequena (SSC). Com os avanços nas tecnologias de sequenciamento de nova geração houve um rápido aumento de plastomas completos sequenciados (Poczai & Hyvönen., 2017). Os plastomas sequenciados contém de 100 a 120 genes, dos quais aproximadamente 70 a 88 são genes codificadores de proteínas, 33 a 35 são tRNAs e quatro são rRNAs (Wicke et al. 2011).

Nos últimos anos as sequências de DNA plastidial forneceram informações importantes sobre ecologia e evolução das plantas, esse contínuo uso de sequenciamento de plastídios se deve principalmente por ser um genoma mais acessível para a biologia molecular, com sequências altamente conservadas e quase sem recombinação (Twyford, & Ness, 2017). Algumas características biológicas dos plastídios os tornam ideais para

vários tipos de estudos, como por exemplo, a herança uniparental faz com que as sequências sejam informativas para estudos de genética populacional, podendo investigar até o fluxo de sementes e tamanho populacional (Wu & Chaw 2014). Em linhas gerais, os plastídios são constituídos por genes para fotossíntese e síntese de proteínas, sendo assim, um alvo importante para estudos de vias bioquímicas e funções celulares (Zhou et al., 2023). Tais rearranjos genômicos também podem ser úteis para entender tendências filogenéticas e evolutivas dentro e entre grupos de plantas (Lopes et al. 2017)

Dyckia brevifolia Baker é uma espécie da família Bromeliaceae endêmica do Sul do Brasil. A espécie *D. brevifolia* é uma reófito e está restrita às regiões rochosas às margens do rio Itajaí-Açu, em Santa Catarina, formando aglomerados e caracterizado pela forma triangular de suas folhas em tom verde claro (Rogalski, 2007)

Estudos de filogenia da subfamília Pitcairnioideae, à qual pertence o gênero *Dyckia*, baseados em genes plastidiais têm sido realizados com o objetivo de entender as relações evolutivas desse grupo de plantas (Gomes-da-Silva et al, 2019; Krapp et al, 2014; Pinangé et al, 2016). Contudo, não há genoma plastidial completo publicado para o gênero *Dyckia*. Considerando a escassez de estudos genômicos disponíveis para a espécie e seu gênero e com objetivo de fornecer novos recursos genômicos para *Dyckia brevifolia* Baker, o presente estudo objetivou caracterizar o genoma plastidial da espécie usando a tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (SNG). Além disso, foi possível comparar as sequências de cpDNA entre outras espécies de bromélias usando conjuntos de dados genômicos publicamente disponíveis, a fim de estudar algumas características da evolução da espécie.

Material e métodos

Sequenciamento e montagem do plastoma

O DNA total de uma planta adulta de *D. brevifolia* cultivada no herbário da UFSC foi isolado de folhas saudáveis através do método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), tratado com RNase e diluído em água ultrapura. A quantidade e a qualidade do DNA isolados foram verificadas através do espectrofotômetro NanoDrop 1000[®] em relação a concentração e razões de absorvância 260/280 e 260/230. A integridade (ausência de degradação) das amostras de DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed e visualizado sob luz ultravioleta. A quantificação do DNA para o preparo da biblioteca genômica foi realizada com auxílio de um fluorímetro Qubit[®].

O sequenciamento do genoma foi realizado por meio do sistema Oxford Nanopore Technologies MinION® Mk1B. Para o preparo da biblioteca genômica da espécie foram utilizados o Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 (Oxford Nanopore®), Ultra II End Repair/dA- Tailing Module (NEB®), Quick Ligation Module (NEB®) e FFPE DNA Repair Mix (NEB®). O sequenciamento foi realizado em uma flowcell R9.0 e a plataforma Guppy foi utilizada para realizar o *basecalling* de cada sequenciamento, enquanto a limpeza das *reads* foi realizada com o software Porechop.

As *reads* limpas foram aplicadas em uma montagem referenciada do plastoma usando o software CLC Genomics (Quiagen, Hilden, Alemanha) e os plastomas de *Ananas comosus* e *Puya ferruginea* como referências. As espécies utilizadas como referência foram selecionadas devido à relação filogenética com as espécies de *Dyckia*. O mesmo software foi utilizado para estimar as estatísticas de cobertura da montagem referenciada (comprimento total do consenso, %GC, fração da referência coberta e cobertura média do cpDNA).

A anotação foi realizada na plataforma GeSeq (Tilich et al., 2017; <https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>). A representação gráfica do mapa circular do plastoma sequenciado foi reconstruída usando a ferramenta OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) (Greiner et al., 2019), utilizando os gêneros *Puya* e *Ananas* como referência, já que esses são os gêneros mais próximos de *Dyckia* com sequências de plastomas disponíveis no GenBank.

Caracterização do genoma plastidial de *D. brevifolia* e relações filogenéticas com espécies da família Bromeliaceae

Sítios de edição de RNAs foram preditos usando PREPACT 3.0 (<http://www.prepact.de/prepact-main.php>; Lenz et al., 2018), com *Oryza sativa*, *Zea mays* e *Cocos nucifera* como espécies referência.

Foram realizadas diferentes comparações entre o plastoma de *D. brevifolia* e 9 espécies da família Bromeliaceae (*Puya goudotiana*, *Puya macrura*, *Puya macropoda*, *Puya raimondii*, *Puya santosi*, *Puya hutchisonii*, *Puya nitida*, *Puya ferruginea* e *Ananas comosus*), cujas sequências de genoma plastidial foram obtidas no Genbank e listadas na tabela 1. A nomenclatura das espécies neste estudo segue o Índice Internacional de Nomes

de Plantas (www.ipni.org). Uma comparação inicial par-a-par da ordem dos genes dos cpDNAs foi realizada por meio de uma análise de gráficos de pontos usando o software online Mafft (Kato et al. 2017). Translocações, inversões ou indels que ocorrem em conjunto de genes são visualizados na comparação par-a-par como deslocamentos das inclinações positivas e/ou negativas representando as regiões LSC, SSC (inclinação positiva) e IR (inclinação negativa) dos genomas plastidiais comparados.

Tabela 1. Genomas de referência usados na análise comparativa de plastomas de *Dyckia brevifolia*

Espécies	Número de acesso Genbank ¹	Tamanho do plastoma (pb)	LSC (pb)	SSC (pb)	IR (pb)
<i>Puya ferruginea</i>	NC_062151.1	159713	18580	87642	53488
<i>Puya guodotiana</i>	NC_062150.1	159757	87669	18587	53498
<i>Puya hutchisonii</i>	NC_062152.1	159839	87742	18596	53498
<i>Puya macropoda</i>	NC_062153.1	159828	87733	18594	53498
<i>Puya macrura</i>	NC_062147.1	159826	87732	18593	53498
<i>Puya santosii</i>	NC_062149.1	159752	87665	18586	53498
<i>Puya nitida</i>	NC_062146.1	159799	87712	18586	53498
<i>Tillandsia cyanea</i>	NC_064985.1	157602	88218	18064	53320
<i>Ananas comosus</i> cultivar <i>erectifolius</i>	MZ457322.1	159983	87787	18605	53590

Legenda: LSC: Região Longa de Cópia Única; SSC: Região Curta de Cópia Única; IR: Região Invertida. pb

Foi realizada uma análise filogenômica usando as sequências completas dos plastomas de *D. brevifolia* e mais 9 espécies da família Bromeliaceae. A sequência do genoma plastidial de *Tillandsia cyanea* foi usada como grupo externo. Além disso, espécies do gênero *Hechtia* (Bromeliaceae) foram utilizadas nas análises a fim de comparação entre representantes das bromélias. As sequências foram alinhadas usando a plataforma online Mafft (Kato et al. 2017), e a árvore filogenética foi construída com o algoritmo Neighbor-Joining. O suporte da análise foi determinado por meio de 500 réplicas de bootstrap usando o mesmo software.

Rearranjos e inversões nos plastomas de Bromeliaceae foram visualizados usando os parâmetros padrões do software de Alinhamento Múltiplo de Genomas MAUVE 2.4.0 (Darling, 2004). Regiões de divergências de sequência foram determinadas usando a análise de janelas deslizantes com os genomas plastidiais completos das 11 espécies de bromeliáceas, com um comprimento de janela de 400pb e um tamanho de passo de 100pb, usando o software DnaSP v.5 (Librado e Rozas 2009).

Resultados e discussão

Características gerais do plastoma de *D. brevifolia*

O genoma plastidial de *Dyckia brevifolia* (ID GenBank 2774730) tem um comprimento de 159552 pb e a estrutura quadripartida tradicional dos plastomas (Figura 1) com um teor de GC de 37%. A região longa de cópia única (LSC) é composta por 87413 pb, e a região pequena de cópia única (SSC) contém 18672 pb. As regiões LSC e SSC são separadas por duas regiões de repetição invertida (IRs) de 26728 pb cada. Um total de 95 genes, incluindo 59 genes codificadores de tRNA (RNA de transferência) e 8

genes codificadores de rRNA (RNA ribossômico) foram previstos.

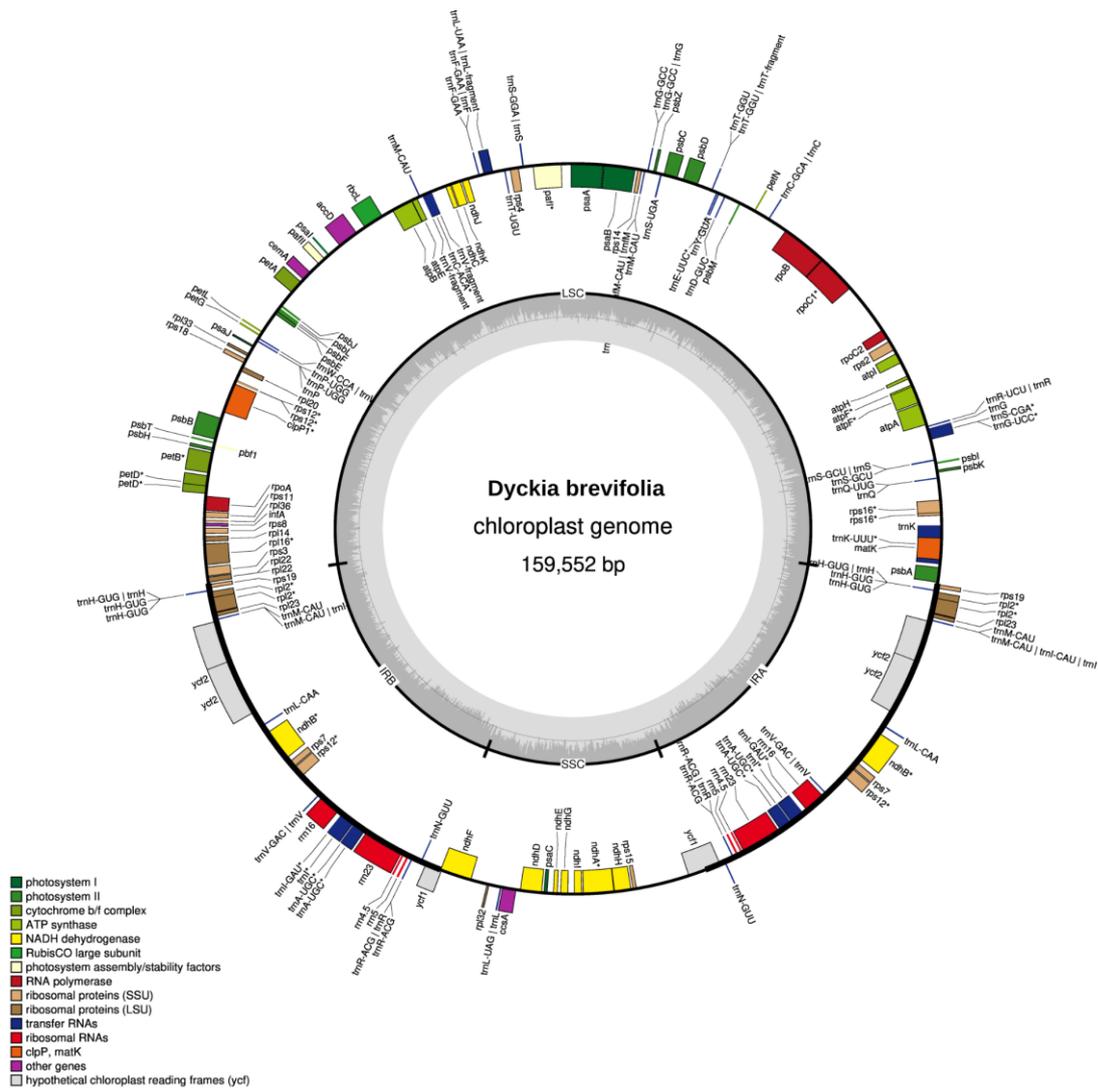


Figura 1. Mapa circular do genoma plastidial de *Dyckia brevifolia*. Genes de diferentes grupos funcionais estão coloridos diversamente. Genes dentro do círculo são transcritos em sentido anti-horário, e aqueles fora do círculo são transcritos em sentido horário. O círculo interno cinza escuro representa o conteúdo GC, e o cinza claro o conteúdo AT.

Análise comparativa entre os genomas de cloroplasto de espécies de Bromeliaceae

Em relação às espécies aqui comparadas, o tamanho de plastoma de *D. brevifolia* é muito semelhante tanto a *Ananas* como a *Puya*, mostrando que há uma relação entre esses três gêneros (Figura 2) e uma desconexão com o gênero *Hetchia* da mesma família.

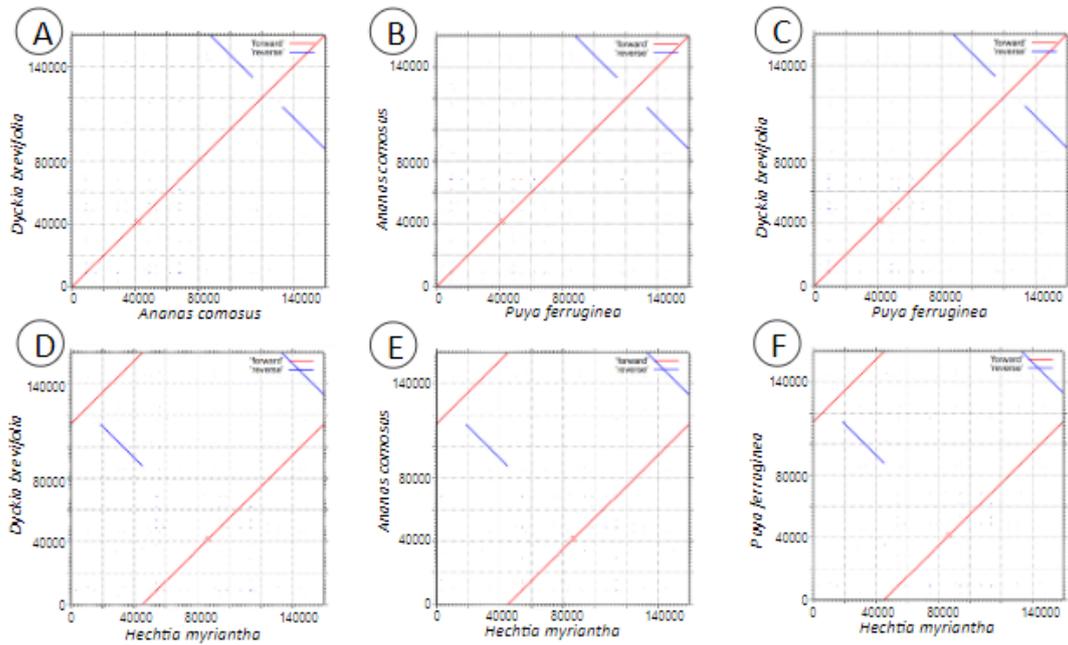


Figura 2. Relação entre os genomas plastídias de *Dyckia brevifolia* e espécies de Bromeliaceae. A análise de gráfico de pontos do genoma de *Dyckia brevifolia* contra três espécies de Bromeliaceae. A inclinação vermelha positiva significa que o par de sequências comparadas é na mesma orientação. A inclinação azul negativa denota que o par de sequências comparadas podem ser alinhadas, mas sua orientação é oposta. No gráfico de pontos em (D); (E) e (F) destacam lacunas e diferença de posição entre os genomas de *D. brevifolia*, *Puya ferruginea* (subfamília Puyoideae) e *Ananas comosus* (subfamília Bromelioideae) contra *Hetchia myriantha* (subfamília Hetchioideae).

Plastomas completos são uma fonte de dados valiosa para resolver relações filogenéticas. Tradicionalmente, Bromeliaceae foi dividida em três subfamílias com base em caracteres florais, de frutos e de sementes: Pitcairnoideae, Bromelioideae e Tillandsioideae (Smith & Till, 1998). A maioria dos estudos filogenéticos confirmaram a monofilia de Tillandsioideae e Bromelioideae, enquanto Pitcairnoideae foi dado como parafilético (Horres et al, 2007; Winter & Smith, 2004). Assim, Givnish e colaboradores (2007) sugeriram uma classificação de oito subfamílias para bromélias, dividindo Pitcairnoideae em Brocchinoideae, Lindmanioideae, Hetchioideae, Navioideae, Pitcairnoideae ss. e Puyoideae. Em estudos posteriores, Givnish (2011) confirmaram esta classificação, com maiores níveis de suporte para a monofilia de cada subfamília, exceto para Puyoideae e Bromelioideae, com uma posição acirrada de Puyoideae em

Pitcairnoideae (Schutz et al, 2016). Assim, ainda há incerteza nas relações filogenéticas das bromélias e ainda é necessário mais estudos com amostragem maior de espécies.

Aqui, montamos uma filogenia limitada entre representantes do gênero *Puya* (Puyoideae), um representante de *Ananas* (Bromelioideae) e *Hetchia* (Hetchioideae) de Bromeliaceae de acordo com o genoma plastidial (Figura 3.)

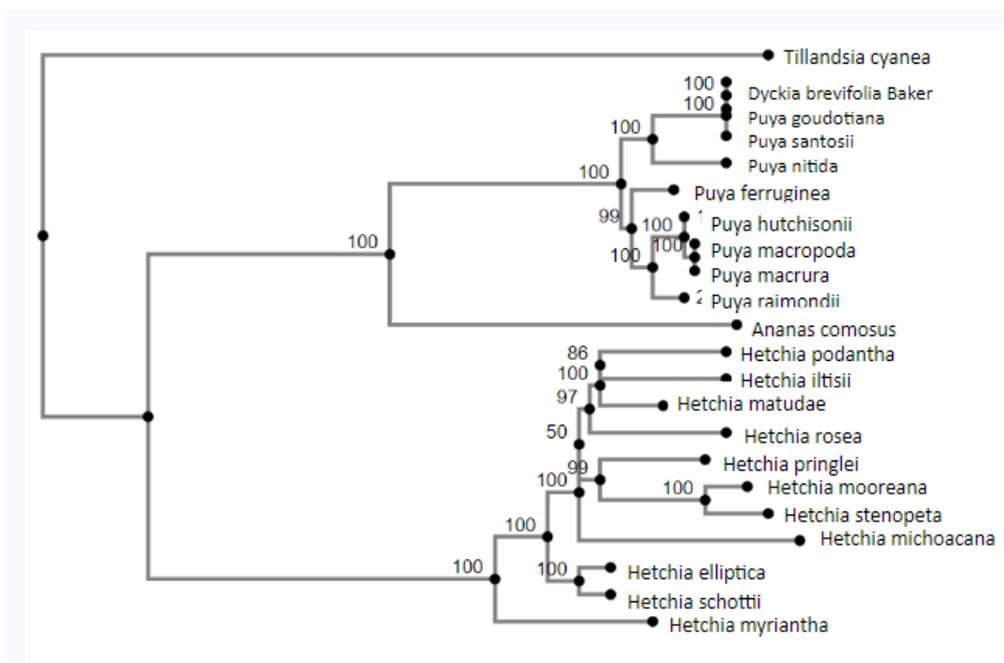


Figura 3. Árvore filogenética de representantes de Bromeliaceae. os números em cima de cada ramificação representam os números de bootstrap.

De acordo com a proximidade de *Dyckia* com todos os membros aqui relatados de *Puya*, percebe-se a relação de proximidade entre esses gêneros. Uma maior amostragem de representantes do gênero *Dyckia* é necessária para entender as relações filogenômicas presentes.

As análises de janela deslizante utilizando o software DnaSP revelaram regiões variáveis entre o plastoma de *D. brevifolia* e outras 8 espécies de *Puya* (Figura 4). Quando esses 9 plastomas foram comparados, a diversidade genética (valor π) em todo o plastoma foi de $\pi = 0,00130$; com 544 regiões de polimorfismo. A região mais variável é o espaçador codificante *trnM-CAU – trnG-GCC* com $\pi = 0,04944$, um gene nomeado como iniciador Met tRNA e Gly tRNA. A segunda maior região codificadora com diversidade genética foi *trnS-UGA*, com valor de $\pi = 0,04$, seguido por *rpl22*, com $\pi = 0,02444$ e *ndhE*, com $\pi = 0,022222$ (Zheng et al., 2020).

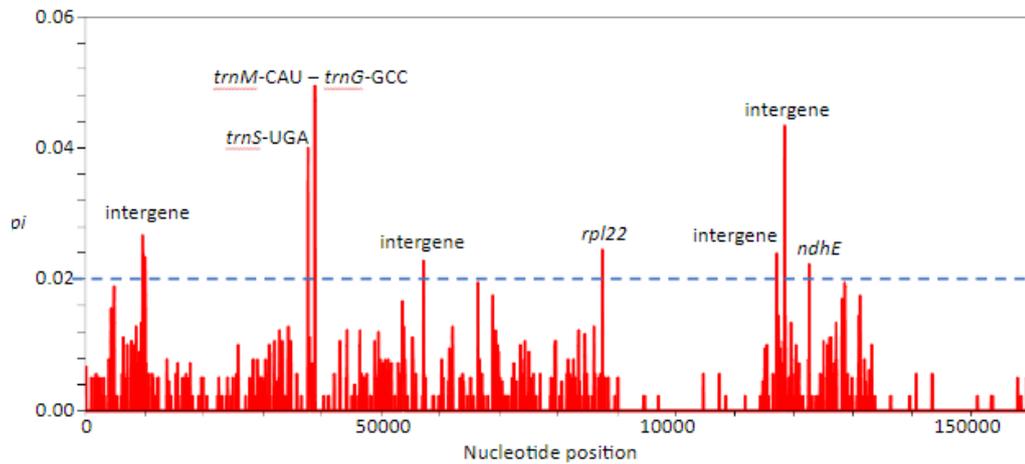


Figura 4. Análise de janela deslizante. O eixo X representa a posição no genoma, enquanto o eixo Y representa os valores Pi correspondentes. O comprimento da janela foi definido para 400 pb com um tamanho de passo de 100pb. A linha pontilhada representa o ponto de corte considerado para determinação de regiões de alto polimorfismo (20x o valor médio de diversidade π).

Os genes *ndh* estão relacionados com a integração funcional no transporte fotossintético de elétrons. Assim, o papel funcional do gene *ndhE* é relacionado a adaptação da fotossíntese à terra. Martín (2010) sugere que esse gene poderia fornecer uma ferramenta útil para investigar fatores ambientais significativos que influenciaram a evolução das plantas, devido a descoberta de locais de edição *ndh* com correções C para T ao nível do genoma podem fornecer ferramentas para resolver relações filogenéticas entre gêneros e espécies intimamente relacionados.

Em geral, perdas significativas do gene *ndh* têm sido comumente relatadas para plantas parasitas, micoheterotróficos e plantas carnívoras, associadas à redução ou ausência de atividade fotossintética (Ruhlman et al, 2015; Baret et al, 2019; Yao et al, 2019). No entanto, múltiplas perdas foram relatadas em linhagens de plantas totalmente fotossintéticas, como gimnospermas, plantas aquáticas e espécies xerófitas (Strand et al, 2019; Mower et a, 2021; Yao et al, 2019). Estudos anteriores descobriram que esses genes foram, em alguns casos, translocados para outros compartimentos do genoma, como

genoma mitocondrial em algumas linhagens de Orchidaceae (Lin et al, 2015) ou genoma nuclear (Sanderson et al, 2015), embora provavelmente não sejam funcionais.

A diversidade genética nas regiões intergênicas entre os genomas também se destacou, com π variando de 0,02222 a 0,04333. Além das mutações de nucleotídeos, inserções/deleções (indels) são outro tipo comum de variação genética nos genomas plastidiais. Oitenta e três indels foram detectados entre os genomas, com $\pi = 0,00020$.

O alinhamento do genoma plastidial de *D. brevifolia* com as espécies de *Puya* demonstrou forte correlação entre as posições de genes dentro do genoma plastidial (Figura 5). Isso corrobora a proximidade aqui destacada entre a espécie *Dyckia brevifolia* e espécies do gênero *Puya*.

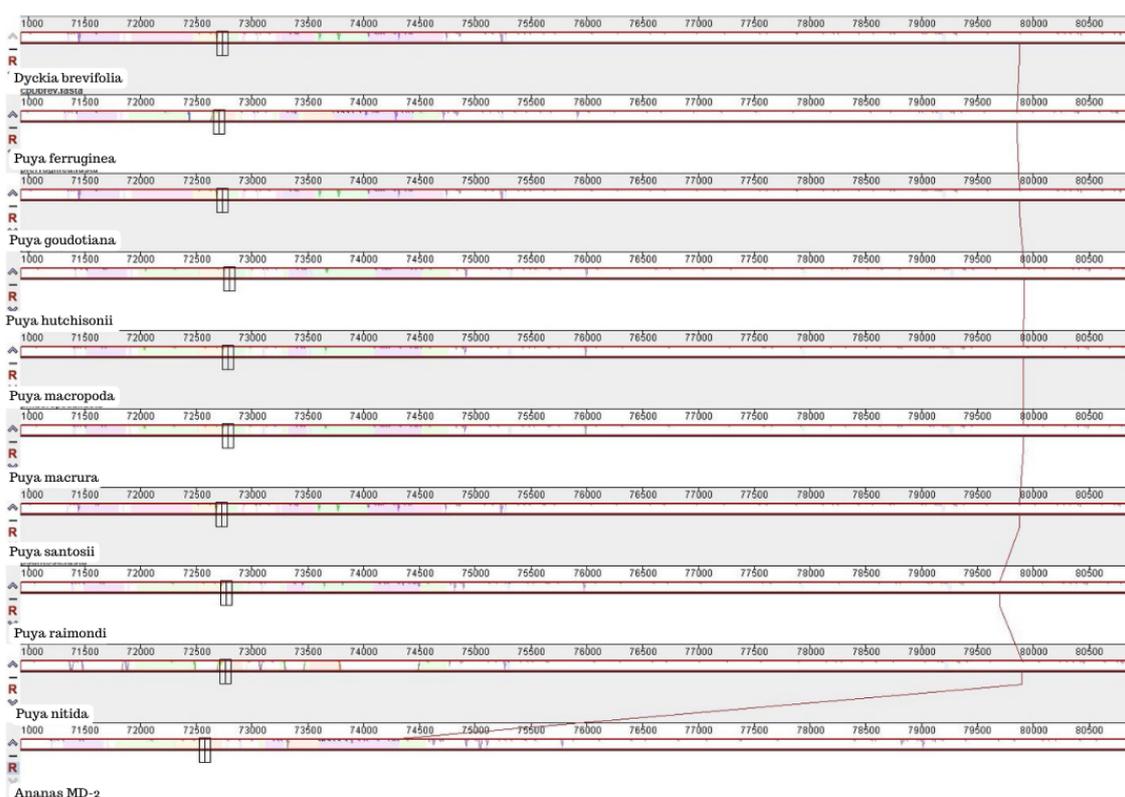


Figura 5. Alinhamento dos genomas plastidiais gerado pelo software Mauve para as espécies *Dyckia brevifolia*; *Puya ferruginea*; *Puya goudotiana*; *Puya hutchisonii*; *Puya macropoda*; *Puya macrura*; *Puya santosii*; *Puya raimondi*; *Puya nitida* e *Ananas comosus*

Um total de 279 sítios de edição foram preditos em 40 genes do plastoma de *D. brevifolia* (Tabela 1). A edição de RNA permite alterações na informação genética nas transcrições primárias nos plastídios em muitos organismos vivos. Essas modificações geralmente resultam em alterações de aminoácidos e afetam a funcionalidade dos produtos proteicos (Tillich et al., 2006). A edição mais comum ocorre em citocinas

específicas, onde através de uma reação de deaminação, elas são modificadas para uracilas (C-para-U) (Guo et al., 2015). Este processo foi proposto como um meio evolutivo para restaurar a sequência original de aminoácidos em genes que possuem mutações (Castandet and Araya, 2011).

Tabela 2. Predição de genes e valores de sítios editados no plastoma de *Dyckia brevifolia* Baker, utilizando *C. nucifera*, *O. sativa* e *Z. mays* como referências. Cada (+) indica a presença de edição em uma das espécies referência.

Gene	Edição	Sítios
<i>rpoC2</i>	+++	15
<i>rpoC1</i>	+++	20
<i>rpoB</i>	+++	16
<i>rps14</i>	+++	6
<i>psaB</i>	+++	3
<i>ycf3</i>	+++	12
<i>ndhJ</i>	+++	3
<i>ndhK</i>	++	1
<i>ndh3</i>	+++	6
<i>atpB</i>	+++	3
<i>rbcL</i>	+++	3
<i>accD</i>	++	5
<i>psaI</i>	+++	6
<i>ycf4</i>	+++	3
<i>ycf10</i>	+++	3
<i>psbF</i>	+++	3
<i>rpl20</i>	++	2

<i>clpP</i>	+++	3
<i>petB</i>	+++	6
<i>petD</i>	+++	3
<i>rpoA</i>	+++	8
<i>rpl36</i>	+++	3
<i>rps8</i>	+++	3
<i>rps3</i>	+++	6
<i>psbA</i>	+++	3
<i>matK</i>	++	3
<i>aptA</i>	+++	6
<i>atpF</i>	+++	6
<i>atpI</i>	+++	6
<i>rps2</i>	+++	12
<i>rpl22</i>	+++	3
<i>rl2</i>	+++	6
<i>rpl23</i>	+++	8
<i>ndhB</i>	+++	54
<i>ndhF</i>	+++	9
<i>ccsA</i>	+++	3
<i>ndhD</i>	+++	12
<i>ndhG</i>	+++	6

Dentre os genes que apresentaram sítios de edição de RNA, o gene *ndhB* apresentou o maior número de sítios (54) e o menor número de sítios para o gene *ndhK* (Tabela 1). A quantidade de sítios de edição em cloroplastos varia entre as espécies.

Foram identificados 2 sítios de edição em *Physcomitrella patens* e 509 em *Anthoceros formosae* (Kugita 2003; Miyata and Sugita, 2004), ambas pteridófitas e 43 sítios em *Arabidopsis thaliana* (Ruwe et al., 2013). Essa expressiva diferença no número de sítios de edição entre espécies tem sido alvo de pesquisas que visam compreender o papel da edição de RNA na evolução do genoma plastidial (Takenaka et al., 2013; Vu & Tsukahara, 2017).

O alto número de sítios de edição no gene *ndhB* foi estudado em tabaco, quando sob uma temperatura de 42°C o bloqueio de edição ocorre especificamente em 19 sítios e o processamento através de splicing neste gene é comprometido (Karcher & Bock, 2002).

Portanto, é possível visualizar através dos resultados aqui obtidos, que os gêneros *Puya*, *Dyckia* e *Ananas* possuem semelhanças na configuração de suas sequências. Além disso, os resultados sugerem que os altos números de sítios de edição de RNA em genes relacionados ao complexo *ndh* podem estar relacionados a adaptação ao estresse abiótico vivenciado pelo gênero *Dyckia*.

Conclusão

Este estudo apresenta importantes recursos para o aprimoramento de análises filogenômicas baseadas em genomas cloroplastidiais do gênero *Dyckia*, sendo este o primeiro genoma plastidial a ser sequenciado, montado e anotado para uma espécie deste gênero. Os resultados deste estudo implicam em conhecimentos importantes nas áreas de genética, evolução e conservação de *Dyckia brevifolia* Baker. Aqui foi descrito o genoma plastidial completo de *D. brevifolia*, uma bromélia reófita endêmica do Sul do Brasil, esta descrição revelou a existência de semelhanças entre os plastomas de espécies da subfamília Puyoideae, assim como *Ananas*. Os genes *ndhE* e *rpl22* podem estar relacionados à adaptação do habitat e ao crescimento e reprodução das plantas sob pressão de seleção, embora estudos mais conclusivos sejam necessários para confirmação desta hipótese. A árvore filogenética construída fornece suporte para entender a relação de *Dyckia* com *Puya*.

Referenciais

CASTANDET B AND ARAYA A (2011) RNA editing in plant organelles Why make it easy? **Biochem (Mosc)** 76:924-931

CRAIG F BARRETT, BRANDON T SINN, AARON H KENNEDY, Unprecedented Parallel Photosynthetic Losses in a Heterotrophic Orchid Genus, **Molecular Biology and Evolution**, Volume 36, Issue 9, September 2019, Pages 1884–1901,

DARLING, A.C.E., 2004. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. **Genome Res** 14:1394-1403. DOI: 10.1101/gr.2289704

DESERAH D. STRAND, LUCIO D'ANDREA, RALPH BOCK; The plastid NAD(P)H dehydrogenase-like complex: structure, function and evolutionary dynamics. **Biochem J** 15 October 2019; 476 (19): 2743–2756. doi:

DIEGO S. B. PINANGE*, FLORIAN KRAPP, GEORG ZIZKA, DANIELE SILVESTRO, ELTON M. C. LEME, KURT WEISING and ANA M. BENKO-ISEPPO Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2016. With 5 figures **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2017, 183, 39–56. With 5 figures

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11-15, 1987.

FENGRONG ZHENG, BO WANG, ZHEN SHEN, ZONGXING WANG, WEI WANG, HONGZHAN LIU, CLAIRE WANG, MAOSHENG XIN, The chloroplast genome sequence of the green macroalga *Caulerpa okamurae* (Ulvophyceae, Chlorophyta): Its structural features, organization and phylogenetic analysis, **Marine Genomics**, Volume 53, 2020, 100752, ISSN 1874-7787, <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100752>.

FLORIAN KRAPP, DIEGO SOTERO DE BARROS PINANGE, ANA MARIA BENKO-ISEPPON, ELTON M. C. LEME, KURT WEISING. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Syst Evol** (2014) 300:1591–1614 DOI 10.1007/s00606-014-0985-0

GANG YAO, JIAN-JUN JIN, HONG-TAO LI, JUN-BO YANG, VENKATA SHIVA MANDALA, MATTHEW CROLEY, REBECCA MOSTOW, NORMAN A. DOUGLAS, MARK W. CHASE, MAARTEN J.M. CHRISTENHUSZ, DOUGLAS E. SOLTIS, PAMELA S. SOLTIS, STEPHEN A. SMITH, SAMUEL F. BROCKINGTON, MICHAEL J. MOORE, TING-SHUANG YI, DE-ZHU LI, Plastid phylogenomic insights into the evolution of Caryophyllales, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Volume 134, 2019, Pages 74-86, ISSN 1055-7903, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.023>.

GREINER S, SOBANSKI J, BOCK R (2014) Why are most organelle genomes transmitted maternally? **Bioessays**, 37(1): 80-94.

GREINER, S.; LEHWARK, P.; BOCK, R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. **Nucleic Acids Research** 47: W59-W64, 2019.

GUO W, GREWE F AND MOWER JP (2015) Variable Frequency of Plastid RNA Editing among Ferns and Repeated Loss of Uridine-to-Cytidine Editing from Vascular Plants. *PLoS One* 10:e0117075. doi: 10.1371/journal.pone.0117075

JANAÍNA GOMES-DA-SILVA, FERNANDA SANTOS-SILVA & RAFAELA CAMPOSTRINI FORZZA (2019) Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae), *Systematics and Biodiversity*, 17:5, 467-490, DOI: 10.1080/14772000.2019.1646834

JEFFREY P. MOWER, WENHU GUO, RAGHAVENDRAN PARTHA, WEISHU FAN, NICK LEVSEN, KIRSTEN WOLFF, JACQUELINE M. NUGENT, NATALIA PABÓN-MORA, FAVIO GONZÁLEZ. Plastomes from tribe Plantagineae (Plantaginaceae) reveal infrageneric structural synapomorphies and localized hypermutation for *Plantago* and functional loss of *ndh* genes from *Littorella*, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Volume 162, 2021, 107217, ISSN 1055-7903

KARCHER D AND BOCK R (2002) Temperature sensitivity of RNA editing and intron splicing reactions in the plastid *ndhB* transcript. **Curr Genet** 41:48–52. doi: 10.1007/s00294-002-0278-y

KATO H K., ROZE WICKI J., YAMADA K.D., 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics** bbx108. DOI: 10.1093/bib/bbx108

KUGITA M (2003) RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. **Nucleic Acids Res** 31:2417–2423. doi: 10.1093/nar/gkg327

LIBRADO P., ROZAS J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25:1451-1452. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp187

LIN, CS., CHEN, J., HUANG, YT. ET AL. The location and translocation of *ndh* genes of chloroplast origin in the Orchidaceae family. **Sci Rep** 5, 9040 (2015).

LOPES A.S., PACHECO T.G., NIMZ T., VIEIRA L.N., GUERRA M.P., NODARI R.O., SOUZA E.M., PEDROSA F.O., ROGALSKI M., 2018. The complete plastome of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] and extensive molecular analyses of the evolution of plastid genes in Arecaceae. **Planta** 247: 1011-1030. DOI: 10.1007/s00425-018-2841-x

MERCEDES MARTÍN, BARTOLOMÉ SABATER, PLASTID *ndh* genes in plant evolution, **Plant Physiology and Biochemistry**, Volume 48, Issue 8, 2010, Pages 636-645, ISSN 0981-9428, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.04.009>.

MIYATA Y AND SUGITA M (2004) Tissue- and stage-specific RNA editing of *rps14* transcripts in moss (*Physcomitrella patens*) chloroplasts. **J Plant Physiol** 161:113–115. doi: 10.1078/0176-1617-01220

POCZAI, P.; HYVONEN, J. The complete chloroplast genome sequence of the CAM epiphyte Spanish moss (*Tillandsia usneoides*, Bromeliaceae) and its comparative analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187199, 2 nov. 2017.

QUIGLEY, F., WEIL, J.H. Organization and sequence of five tRNA genes and of an unidentified reading frame in the wheat chloroplast genome: evidence for gene rearrangements during the evolution of chloroplast genomes. **Curr Genet** 9, 495–503 (1985).

RUWE H, CASTANDET B, SCHMITZ-LINNEWEBER C AND STERN DB (2013) Arabidopsis chloroplast quantitative editotype. **FEBS Lett** 587:1429–1433. doi: 10.1016/j.febslet.2013.03.022

SANDERSON, M.J., COPETTI, D., BÚRQUEZ, A., BUSTAMANTE, E., CHARBONEAU, J.L.M., EGUIARTE, L.E., KUMAR, S., LEE, H.O., LEE, J., MCMAHON, M., STEELE, K., WING, R., YANG, T.-J., ZWICKL, D. AND WOJCIECHOWSKI, M.F. (2015), Exceptional reduction of the plastid genome of saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*): Loss of the *ndh* gene suite and inverted repeat. **American Journal of Botany**, 102: 1115-1127.

TAKENAKA M, ZEHRMANN A, VERBITSKIY D, HÄRTEL B AND BRENNICKE A (2013) RNA Editing in Plants and Its Evolution. **Annu Rev Genet** 47:335–352. doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133519

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S., 2013. MEGA6: MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS VERSION 6.0. **Mol. Biol. Evol.** 30:2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197

TILLICH M, LEHWARK P, MORTON BR, MAIER UG (2006) The evolution of chloroplast RNA editing. **Mol Biol Evol** 23:1912–1921. doi: 10.1093/molbev/msl054

TWYFORD A. D.; NESS, R. W. Strategies for complete plastid genome sequencing. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 5, p. 858–868, 2017.

VU LT AND TSUKAHARA T (2017) C-to-U editing and site-directed RNA editing for the correction of genetic mutations. **Biosci Trends** 11:243–253. doi: 10.5582/bst.2017.01049

WANG, Y.-C.; ZHOU, H.-Y.; LIU, X.-Q. Chloroplast Genomic Variation in *Euonymus maackii* Rupr. and Its Differentiation Time in *Euonymus*. **Forests** **2022**, *13*, 265.

WICKE, S., SCHNEEWEISS G.M., DEPAMPHILIS C.W., MÜLLER K.F., QUANDT D., 2011. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. **Plant Mol Biol** 76: 273-297. DOI: 10.1007/s11103-011-9762-4

WU CS, CHAW SM (2014) Highly rearranged and size-variable chloroplast genomes in conifers II clade (cupressophytes): evolution towards shorter intergenic spacers. **Plant Biotechnology Journal**, 12(3), 344-353.

ZHOU, W. et al. Plastid Genome Assembly Using Long-read data. **Molecular Ecology Resources**, v. 23, n. 6, p. 1442–1457, 2023.

CAPÍTULO 2

Identificação e Desenvolvimento de Marcadores moleculares Microssatélites (SSR) para *Dyckia brevifolia* Baker

RESUMO

Dyckia é um gênero que inclui 170 espécies classificadas como plantas perenes sem tanques, terrestres ou saxícolas e é um dos gêneros mais ricos em espécies da subfamília Pitcairnioideae. *Dyckia brevifolia* Baker é uma bromélia endêmica do Sul do Brasil e sua ocorrência natural encontra-se ameaçada. Como os *loci* de microssatélites são espécie-específicos é necessário isolá-los para cada espécie. Devido à escassez de conhecimentos genéticos acerca da espécie estudada, esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de marcadores moleculares SSR para *Dyckia brevifolia* Baker contribuindo com a conservação e estudos de diversidade dessa espécie. O DNA total (nuclear, plastidial e mitocondrial) da espécie foi sequenciado utilizando-se uma plataforma de sequenciamento de nova geração MinION® Oxford Nanopore. O DNA genômico foi extraído em quantidade superior a 150 ng.µL⁻¹ para todas as 10 amostras das 3 populações definidas. 15 *loci* microssatélites previamente selecionados *in silico*, seis não participaram para a genotipagem devido a problemas na amplificação. Para a genotipagem foram utilizados 30 indivíduos. Os parâmetros gerais de diversidade genética de *D. brevifolia* mostraram-se baixos. Os marcadores microssatélite desenvolvidos neste estudo apresentaram, em média, moderado a alto número de alelos, com exceção do marcador MK206. Também demonstraram alta capacidade de diferenciar corretamente indivíduos coletados ao acaso dentro de uma população, com baixa probabilidade de erro. Além disso, os marcadores demonstraram potencial para o estudo de fluxo gênico ao caracterizar coerentemente a relação entre os indivíduos provenientes das três diferentes demes estudadas.

1. Introdução

A Mata Atlântica é considerada um dos mais importantes *hotspot* de biodiversidade mundial (Aleixo et al. 2010) com uma grande diversidade de espécies vegetais nativas e endêmicas. Bromeliaceae é uma importante família botânica com distribuição ampla nas Américas, sendo representativa na composição florística da Mata Atlântica. Esta família possui inúmeras espécies com potencial no mercado de frutas e de plantas ornamentais (Stenmann et al. 2009).

Dyckia é um gênero que inclui 170 espécies classificadas como plantas perenes sem tanques, terrestres ou saxícolas e é um dos gêneros mais ricos em espécies da subfamília Pitcairnioideae., o gênero *Dyckia* é um dos três gêneros de Bromeliaceae que formam um clado xerofítico bem suportado (Givnish et al. 2011) e inclui espécies nativas e que prosperam em ambientes com solo pobre e abastecimento de água limitado e alta exposição solar (Santos-Silva et al. 2013).

Dyckia brevifolia Baker é uma bromélia endêmica do Sul do Brasil e sua ocorrência natural encontra-se ameaçada (Rogalski et al., 2017). *D. brevifolia* é uma heliófita, que

tolera plena luz solar, mas também se adapta ao fluxo de um rio, podendo essa adaptação ser na submersão durante as enchentes ou na sua desidratação durante os períodos de seca (Lobo et al. 2013). A espécie faz parte das plantas ornamentais consolidadas brasileiras (Silva Souza et al. 2012) e suas subpopulações (demes) encontram-se em áreas disjuntas do rio Itajaí-Açu em uma área não superior a um hectare (Rogalski et al. 2022).

A conservação da diversidade genética tornou-se objetivo de muitos programas de conservação e o conhecimento da distribuição desta diversidade dentro e entre as populações naturais é o primeiro passo nesse processo (Solórzano et al. 2010). A pesquisa sobre a diversidade genética populacional também é essencial para fornecer informações para o desenho de estratégias de conservação em espécies com risco de extinção e, neste contexto, marcadores moleculares em DNA são ferramentas importantes para estudar a variabilidade genética (Peng et al. 2018)

Vários marcadores moleculares foram utilizados em estudos genéticos em Bromeliaceae: Aloenzimas para *Aechmea tuitensis*, *Dyckia brevifolia*, *Dyckia ibiramensis* (Izquierdo e Piñero, 2000; Rogalski et al. 2017; Hmeljevski et al. 2011); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para *Encholirium biflorum* e *Encholirium pedicellatum* (Cavallari et al. 2006); microssatélites (SSR) para *Alcantarea brasiliana*, *A. nevaresii*, entre outras (Lexer et al. 2016).

Microssatélites ou SSR (“Sequências Simples Repetidas”) são sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas lado a lado, normalmente isoladas de regiões não codificantes. Deste modo, estes marcadores podem ser utilizados para ajudar a resolver problemas que variam desde a taxonomia, questões relacionadas à paternidade, à estrutura genética de populações, comparação entre espécies, sistema de cruzamento e capacidade de colonização de populações (Boneh et al. 2003).

Como os *loci* de microssatélites são espécie-específicos é necessário isolá-los para cada espécie. Devido à escassez de conhecimentos genéticos acerca da espécie estudada, esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de marcadores moleculares SSR para *Dyckia brevifolia* Baker contribuindo com a conservação e estudos de diversidade dessa espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e extração de DNA

Foram coletadas folhas de plantas saudáveis em 3 demes (definidas como Salto W2, Salto W3) da espécie no município de Apiúna, Santa Catarina, totalizando 30 amostras (10 em cada população). As amostras foliares foram armazenadas em tubos Falcon contendo uma solução aquosa de PVP 1% e armazenadas em freezer até o momento da extração do DNA. Uma planta foi selecionada para o sequenciamento parcial do genoma total. Uma exsicata desta planta foi depositada no Herbário Flor da UFSC

O DNA total foi isolado de folhas saudáveis através do método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987). Foram maceradas aproximadamente 200mg de folhas com auxílio de almofariz e pistilo. Logo após, foi acrescentado 2,0ml do tampão de lise (CTAB 2%; EDTA 20mM; NaCl 1,4M; Tris-HCl pH 8,0 100mM; PVP-40 2%; 2-mercaptoetanol 0,1%). O material foi homogeneizado e dividido em dois microtubos de 2,0ml. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65 °C durante 30 minutos, homogeneizados por inversão a cada 10min. Após esse tempo, foram armazenados na bancada até alcançar a temperatura ambiente, e então foi acrescentado 600µl de clorofórmio-álcool isoamílico-CIA (24:1; v/v) em cada tubo, e homogeneizados por inversão durante 3min. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14000 RPM por 5 min. Depois da centrifugação para a separação da parte orgânica e aquosa, foram transferidos 600µl do sobrenadante para novos tubos e foi repetida a extração orgânica com CIA. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 1,5ml, adicionando 400µl de álcool isopropílico a -20°C e incubado por 1h a -20 °C. Posteriormente, foram centrifugados a 14000 RPM por 10 min, e logo após o álcool foi descartado, e acrescentado 1ml de etanol 70% a -20°C, sendo mantido por 3 min para lavagem do DNA precipitado. Depois, o etanol 70% foi descartado, e adicionado 1ml de etanol absoluto a -20°C, mantido por 1 min. Após o descarte do etanol absoluto, o precipitado foi mantido em temperatura ambiente para a secagem total. Em seguida, o DNA foi diluído em 50µl de tampão low-TE (10 mM Tris, 0.01 mM EDTA pH 8,0) com RNase, e mantido por 1h em temperatura ambiente. Para avaliar a quantidade e qualidade do DNA isolado foram verificadas através do espectrofotômetro NanoDrop 1000® em relação a concentração e razões de absorbância 260/280 e 260/230. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

2.2 Sequenciamento do genoma total

O DNA total (nuclear, plastidial e mitocondrial) da espécie foi sequenciado utilizando-se uma plataforma de sequenciamento de nova geração MinION® Oxford Nanopore, flow cells R.9 e o Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 para preparação da biblioteca genômica.

O software Guppy foi utilizado para realizar o *basecalling*, o Medaka para a limpeza das sequências e o Canu para montagem dos *contigs*, além de *pipelines* disponibilizados pela empresa Oxford Nanopore Technologies.

2.3 Identificação de regiões microssatélites (SSR) e desenho de *primers*

O software GMATA (Wang, 2016) foi usado para prospectar motivos de repetição di, tri, tetra e penta-nucleotídeos nos *contigs* obtidos. Os *primers* para os *loci* SSR identificados foram projetados visando a obtenção de alelos com tamanho variando de 90 a 280pb utilizando o mesmo software.

2.4 Validação e caracterização dos marcadores microssatélites

Loci SSR identificados foram testados para amplificação *in silico* no software SPCR (Cao et al. 2015), utilizando como DNA-alvo todos os *contigs* obtidos a partir do presente sequenciamento e montagem do genoma parcial.

Usando essa estratégia foi possível identificar pares de *primers* que amplificaram um único locus dentro do genoma, no intervalo de tamanho esperado, e descartar pares de *primers* gerando ampliações multi-loci e padrões de banda inviáveis. A origem genômica dos *loci* SSR prospectados foi determinada a partir da comparação da sequência dos *contigs* correspondentes a cada locus SSR selecionado com sequências depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST.

A caracterização final dos *loci* SSR selecionados foi realizada a partir da amplificação via PCR do DNA de 30 amostras coletadas em demes da espécie. O mix de PCR foi composto por aproximadamente 30 ng de DNA, 1X tampão de PCR, 0,5 μ M MgCl₂, 1U Taq DNA polimerase, 0,05 μ M de dNTPs, 0,125 μ M de cada *primer* e 0,2 μ L de BSA, em um volume final de 15 μ L. O ciclo de PCR constou de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos com temperatura de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento (temperatura conforme cada par de *primers*) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, com uma etapa final de extensão a 72°C por 20 min. Os produtos de PCR foram avaliados inicialmente em eletroforese horizontal em gel de

agarose 2,5%, corados com GelRed e visualizados através de luz UV. A visualização do resultado obtido nas PCRs foi preparada em uma solução contendo 3ul do DNA amplificado, 2 ul de Gel Red. Esta mistura foi aplicada em um gel de agarose 2,5% em tampão TBE 1X.

Para os *loci* que geraram produtos viáveis na amplificação e eletroforese, foi realizada a validação com a análise das 30 amostras coletadas, utilizando primers marcados com fluorescência e separados em eletroforese capilar em um equipamento ABI 3500xL. A estratégia de amplificação e genotipagem adotada no estudo baseou-se na utilização de primers complexados a moléculas fluorescentes. Em cada reação, foi utilizado um primer *Forward* acrescido com uma extensão ou “cauda” M13 e primer não modificado do tipo *Reverse* conforme descrito por Schuelke (2000). Dessa forma, para a genotipagem utilizando o ABI 3500xL, os mesmos indivíduos puderam ser sobrepostos em uma única placa de 96 poços, sem comprometer a informação individual de cada amostra, uma vez que os picos de luminescência gerados pelas moléculas fluorescentes emitem luz em comprimentos de ondas diferentes. Os marcadores fluorescentes utilizados no método foram o 6-FAM e NED constituinte do conjunto de corantes (Dye Set) DS-33 (Applied Biosystems).

Para a análise dos resultados da genotipagem foram observados manualmente os picos de luminescência, retratados nos eletroferogramas e visualizados através do programa GeneMapper, cuja presença de um único pico pronunciado indica homozigose, enquanto a presença de dois picos indica heterozigose. Os alelos de cada indivíduo para cada locus foram registrados em uma planilha de Excel de acordo com o tamanho (em pb) de cada fragmento.

2.5 Análise de dados

A diversidade genética das demes foi analisada por meio dos seguintes parâmetros para os conjuntos de marcadores microssatélites: número médio de alelo (A); número efetivo de alelos (A_e); heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada não-viesada (uHe) e Coeficiente de endogamia (F) utilizando o software GenAlEx versão 6.5.

O mesmo software foi utilizado para calcular a probabilidade de identidade do conjunto de marcadores (probabilidade de que dois indivíduos coletados ao acaso em uma população sejam erroneamente identificados como diferentes, apesar de serem iguais) avaliando a capacidade informativa de n marcadores de forma cumulativa, de 1 a n

incluindo-se um novo marcador em cada ciclo da análise. Visando avaliar a capacidade dos marcadores em identificar indivíduos de diferentes populações e propiciar evidências de fluxo gênico, uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada baseada na distância genética par-a-par entre os indivíduos das três demes estudadas.

3. Resultados e discussão

O DNA genômico foi extraído em quantidade superior a 150 ng.μL⁻¹ para todas as 10 amostras das 3 populações definidas (Figura 1). Essa etapa de quantificação em gel de agarose é importante para verificar a presença de RNA, compostos secundários e degradação do DNA. Bandas bem definidas, com grande quantidade de DNA sem bandas secundárias (RNA) depois da banda principal indicando uma boa qualidade do DNA extraído.

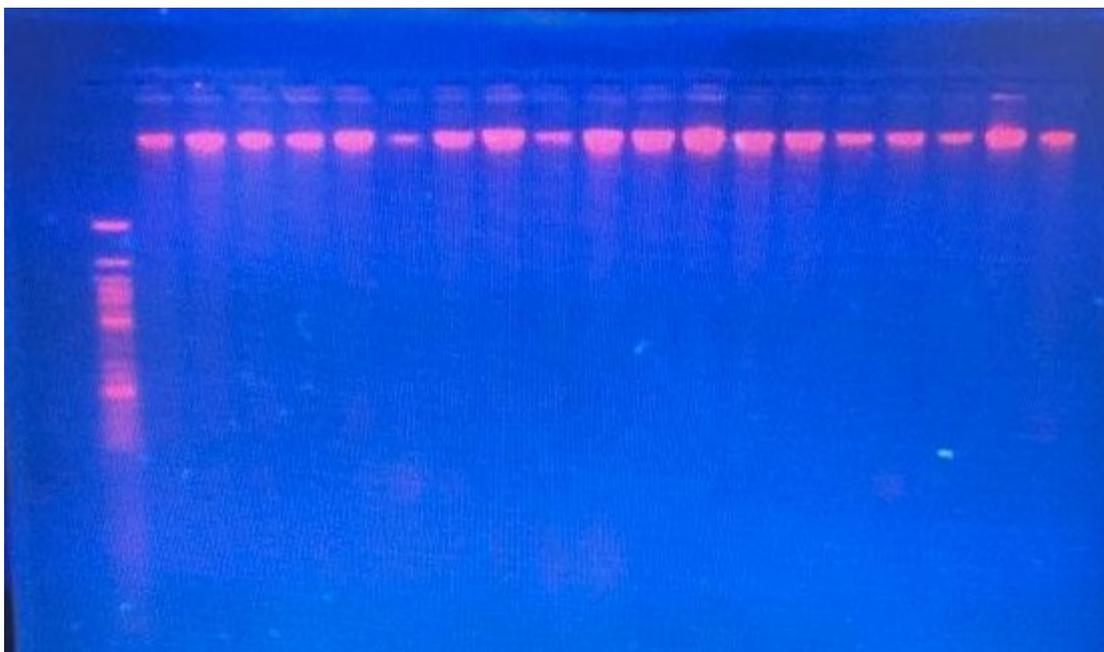


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de DNA de plantas de *Dyckia brevifolia* Baker.

Foram mapeados no genoma de *Dyckia*, um total de 17.115 *loci*SSR com motivos di, tri, tetra e penta-nucleotídeos nos contigs obtidos, com maior número de marcadores os obtidos com motivos AT (23,59%), seguido de TA (22,13%) e AG (8,64%). Destes, 15 *loci* microssatélites foram previamente selecionados *in silico*, seis não concorreram para a genotipagem devido a problemas na amplificação. Para a genotipagem foram utilizados 30 indivíduos. Foram utilizados em análise de dados os marcadores que atingiram um pico mínimo dentro da região do tamanho esperado do marcador, como

ilustrado na figura 2. Então, foram selecionados e validados nove marcadores que estão listados na tabela 1, de acordo com as características definidas.

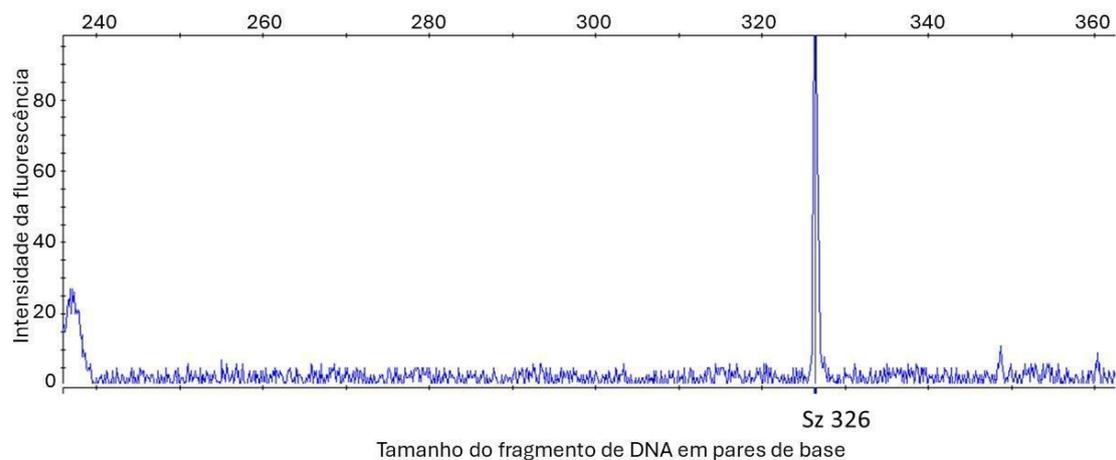


Figura 2. Exemplo de eletroferograma gerado para o locus MK263, utilizando a fluorescência 6-FAM.

Tabela 1. Descrição dos 9 loci microsatélite de *Dyckia brevifolia* Baker, incluindo as sequências dos primers (F-*forward*) e (R-*reverse*), temperatura de anelamento, tamanho alélico esperado de cada locus, motivo de repetição da região microsatélite e cromossomo no qual foi encontrada essa região no genoma de *Ananas comosus* na etapa de caracterização dos marcadores.

Marcador	Sequência de primers	Tm (°C)	Tamanho esperado (pb)	Motivo	Cromossomo
MK105	F: CACACGCCTGCTCTACAAA A R:GGCCAATGGTGCAATTAA AA	60.05 0 60.68	154	CTT(6)	17
MK123	F: TGTGCATGCGTCGGTATATT R: CGAACGTTGGTTACTCCAC A	59.98 3 59.609	380	GA(7)	18

MK146	F: CCACCATCCCAAACAAAGAT T R: TCGAAGATCCAACATCGAA A	59.64 7 59.20 0	227	GA(5) 6
MK196	F: GTTCTCATGGCGAACGATCT R:AACCTAGAGTTGGCGACG AA	60.22 6 59.87 5	155	TA(9) 24
MK20	F: TTACTCGGGCAATCCTTGTT R: ACCGTACCGTGCCAGATAA A	59.56 9 60.38 6	392	TC(5) -
MK206	F: ATCCTCTCCCTCTCCCTCA R: GATGTTGCTTCAGCCTCTCC	60.14 9 59.95 7	127	TA(22) 16
MK243	F: AAGGCTAAGCTCTAGACCA ACAAA R: ATATAGGCTCCAGCCGGTT C	59.97 7 60.43 9	323	GA(5) 13
MK263	F: CGGAACTTCTTCACATGCA A	59.84 0	234	AT(5) 22

	R: GTGGTGGTGGATTTCATTC	60.03 4		
MK209	F: TGGCCTCTATGGAATGATG A R: TTAATGTGGTGGTGGAGC A	59.02 7 59.02 7	400	GA(5) 16

Os parâmetros gerais de diversidade genética de *D. brevifolia* mostraram-se baixos (Tabela 2). Este resultado está de acordo com descobertas anteriores para outras espécies endêmicas restritas de *Dyckia*, *D. divaricata* Leme & H. Buneker, *D. excerta* L.B.Sm (Melo, 2016). discussão ANANAS - CROMOSSOMO

Foi detectado um total de 86 alelos entre os indivíduos amostrados, com o número de alelos por locus (A) variando entre um (MK206) e dez (MK263) com média de detecção de $A = 4,5$ alelos por locus. A heterozigosidade observada (H_o) foi baixa, variando de 0,000 a 0,600, com média de 0,214. O baixo polimorfismo encontrado pode ser causado pelo fato da espécie apresentar propagação clonal, de acordo com dados de estudos com marcadores aloenzimáticos para a mesma espécie (Rogalski, 2007).

Tabela 2. Estimativa de diversidade genética dos 9 loci SSR em 3 demes de *D. brevifolia*.

SSR locus	A	A_e	H_o	uHE	F
MK123	4,000	1,736	0,529	0,437	-0,249
MK206	1,000	1,000	0,000	0,000	0
MK20	D4,000	2,246	0,375	0,555	0,324
MK243	5,000	4,571	0,250	0,893	0,680

MK263	10,000	8,696	0,600	0,932	0,322
MK105	5,000	3,646	0,083	0,757	0,885
MK146	5,000	3,315	0,091	0,732	0,870
MK196	4,000	3,267	0,000	0,747	1,000
MK209	3,000	1,815	0,000	0,484	1,000

A = Número de alelos; A_e = Número efetivo de Alelos; H_o = Heterozigosidade Observada; uHe = Heterozigosidade Esperada Não-viesada; F = índice de fixação

Os valores de heterozigosidade com base em marcadores de aloenzimas são bem reduzidos em comparação aos obtidos por meio de marcadores microssatélites. Essa constatação é reforçada comparando-se dois estudos, cuja finalidade era estudar a diversidade genética da espécie *Pitcairnia geykessi*, realizados por Sarthou et al. (2001) e por Boisselier et al. (2010), nas quais distinguem-se pelo tipo de marcador molecular empregado. O estudo de Sarthou et al. (2001) fez uso de marcadores aloenzimáticos, o que resultou valores reduzidos de heterozigosidade ($H_o = 0,185$), enquanto o estudo desenvolvido por Boisselier et al. (2010) fez uso de marcadores microssatélites e obteve valores moderados de heterozigosidade ($H_o = 0,293$). Embora já tenha sido realizado estudo de diversidade genética da espécie com marcadores aloenzimáticos, torna-se difícil realizar comparações de parâmetros de diversidade entre esse tipo de marcadores e SSR, uma vez que marcadores microssatélites, além de apresentarem valores moderados de heterozigosidade, têm gerado alto polimorfismo nas espécies às quais são empregados (Zanella et al., 2012).

INDICE DE FIXAÇÃO

A perda da diversidade genética, que é a variação de alelos e genótipos presentes em populações, espécies ou grupos de espécies, acarreta a redução do potencial evolutivo das espécies, o que influencia no sucesso reprodutivo das mesmas (Primack *et al.*, 2001; Frankham *et al.*, 2004). Espécies que apresentam populações com número reduzido de indivíduos, de ocorrência em ambientes fragmentados, com forte influência da ação antrópica, merecem elevada atenção por apresentarem riscos iminentes de extinção, uma vez que, sob tais condições, eventos genéticos como deriva gênica e endocruzamentos

podem se tornar mais extremos (Franklin *et al.*, 2008). *Dyckia brevifolia* é uma espécie com reduzido número de representantes, composta por 12 populações ao longo de 80km. É possível que essa espécie apresente baixos índices de diversidade genética e altos coeficientes de endocruzamentos, devido à forte influência da deriva gênica e ao limitado fluxo gênico entre as suas populações.

A partir de um levantamento com base na literatura, em estudos que fizeram uso de marcadores microssatélites nucleares foram obtidos dados provenientes de espécies pertencentes a diferentes gêneros de Bromeliaceae: *Alcanterea*, *Pitcairnia* e *Vriesea*, cujos valores de heterozigiosidade apresentaram-se, em sua maior parte, reduzidos à moderados. Estudos realizados por Barbará *et al.* (2007; 2009) resultaram em valores moderados de heterozigiosidade para as espécies *Alcanterea geniculata* ($H_o = 0,356$), *Alcanterea glaziouna* ($H_o = 0,259$), *Alcanterea imperialis* ($H_o = 0,357$), com exceção da espécie *Alcanterea regina* que apresentou valores elevados ($H_o = 0,458$). Os estudos de diversidade genética realizados por Palma-Silva *et al.* (2009; 2011) também identificaram valores moderados para as espécies *Pitcairnia albiflos* ($H_o = 0,383$), *Pitcairnia staminea* ($H_o = 0,347$), com exceção da espécie *Vriesea gigantea* que apresentou valores mais elevados ($H_o = 0,431$). Dessa forma, é possível observar valores intermediários de H_o na maior parte dos estudos realizado para a família Bromeliaceae, condizente com valores encontrados por este estudo.

A medida mais importante na avaliação da diversidade genética é a heterozigiosidade esperada, também chamada de diversidade de genes ou alélica (Nei, 1987), que corresponde a quantidade de heterozigiosidade presente na subpopulação, ou seja, a proporção média de loci heterozigotos esperada em uma população, quando ocorre predominância de cruzamento ao acaso (Hedrick, 2005). Neste estudo optou-se pela heterozigiosidade esperada não viesada para reduzir efeitos de erros, sabendo que a heterozigiosidade esperada não viesada é uma correção praticamente obrigatória para subpopulações com tamanho amostral (n) menor que 50 (Nei; Roychoudhury, 1974). O menor valor para heterozigiosidade esperada não viesada (uHe) por locus microssatélite foi observado para MK206 (0,000) e o maior valor foi de 0,932 para o locus MK263 (Tabela 2). As heterozigiosidades esperadas não viesadas foram baixas e apresentaram valores que refletem uma baixa diversidade.

O índice de fixação é calculado com base nas frequências observadas (H_o) e esperadas (H_e) de heterozigotos. Em grupos onde o tamanho populacional já é pequeno, os efeitos do gargalo genético causam sérias perdas na diversidade gênica (heterozigosidade esperada). Os valores médios de F nas populações foram positivos e altos (0,536) sugerindo que as demes não se comportam como uma única população panmítica. A endogamia está associada à depressão endogâmica, que reduz a capacidade de uma população de sobreviver e reproduzir como consequência da correlação de alelos por descendência e diminuição da variação genética (Charlesworth & Willis, 2009).

Os nove marcadores validados mostraram-se com alto poder de discriminação de genótipos, como evidenciados pelas probabilidades de identidade e de exclusão encontrados para os locos estudados (Figura 2). Esta análise mostra que com o uso dos nove marcadores, a probabilidade de se identificar erroneamente dois indivíduos como sendo diferentes é de 0,000000000013.

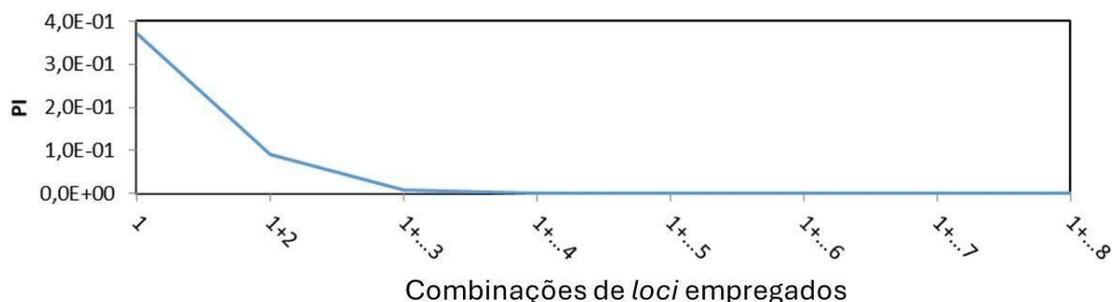


Figura 3. Descritores da probabilidade de identidade de oito marcadores SSR polimórficos na amostra total de 29 indivíduos.

A análise de coordenadas principais (PCoA) das amostragens organizadas nos três grupos populacionais confirma a relação existente entre dois grupos populacionais (JUS e W2) e uma maior distância entre W3 (figura 3).

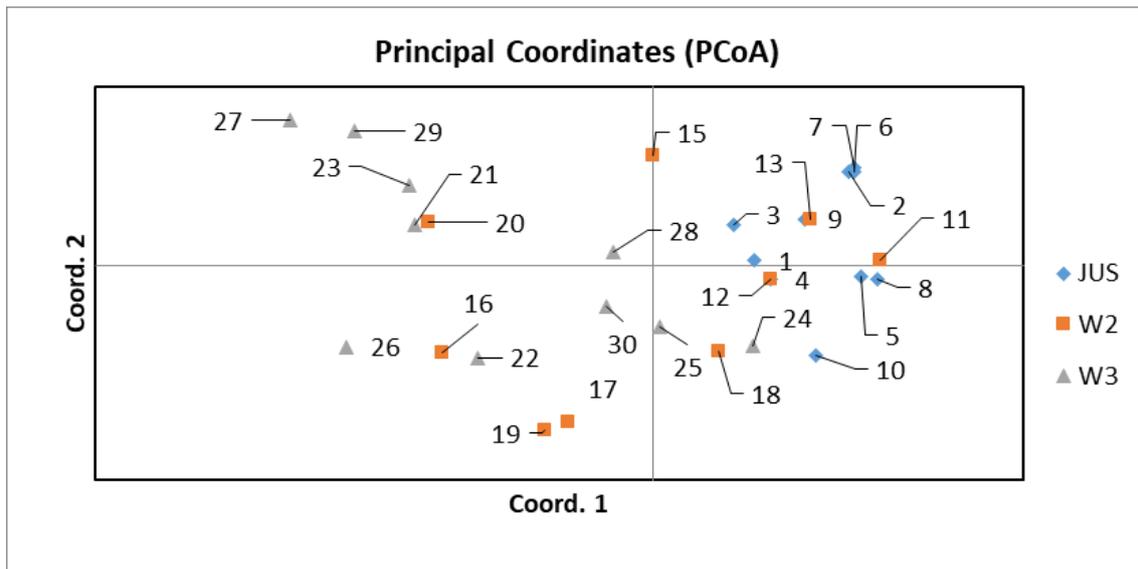


Figura 4. Análise de coordenadas principais de 29 indivíduos de *Dyckia brevifolia* adultos de 3 demes do Rio Itajaí-Açu, Salto Weibach, baseados em genótipos obtidos com nove marcadores microssatélite desenvolvidos neste estudo.

A deme JUS está geograficamente localizada abaixo das demais demes com relação ao fluxo do rio e, portanto, deve possuir uma maior probabilidade de receber propágulos reprodutivos provenientes das demes W2 e W3. Nesse sentido, a análise PCoA demonstra que vários indivíduos das demes W2 e W3 são geneticamente semelhantes aos indivíduos da deme JUS. Considerando a dispersão de plantas devido à corrente do rio, esses indivíduos podem ser geneticamente relacionados aos genitores dos propágulos reprodutivos que atingiram a deme JUS.

4. Conclusão

Os marcadores microssatélite desenvolvidos neste estudo apresentaram, em média, moderado a alto número de alelos, com exceção do marcador MK206. Também demonstraram alta capacidade de diferenciar corretamente indivíduos coletados ao acaso dentro de uma população, com baixa probabilidade de erro. Além disso, os marcadores demonstraram potencial para o estudo de fluxo gênico ao caracterizar coerentemente a relação entre os indivíduos provenientes das três diferentes demes estudadas.

5. Referências

ALEIXO, A; ALBERNAZ, L. A.; GRELE, E. V.; RANGEL, F. 2010. Mudanças Climáticas e a biodiversidade dos Biomas Brasileiros: Passado, Presente e Futuro. **Natuza & Conservação** 08: 194-196.

BARBARÁ, T. ET AL. Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical 'inselbergs': *Alcanterea glaziouana*, *A. regina*, *A. genicula* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). **Ann Bot** 103:65-77, 2009.

BARBARÁ, T. ET AL. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcanterea imperialis* and *Alcanterea geniculata* (Bromeliaceae). **Mol. Ecol** 16:1981-1992, 2007.

BOISSELIER-DUBAYLE. MC ET AL. Genetic structure of the xerophilous bromeliad *Pitcairnia geykesii* on inselbergs in French-Guiana - A test of the forest refuge hypothesis. **Ecography** 33:175-184, 2010.

BONEH L, KUPERUS P, VAN TENDEREM PH (2003) Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. **Mol Ecol Notes** 3:302-303.

CAVALLARI MM, FORZZA RC, VEASEY EA, ZUCCHI MI, OLIVEIRA GCX (2006) Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD Markers. **Biodivers Conserv** 15:4357-4373.

CHARLESWORTH, B. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. **Nature Review Genetics**, v. 10, n. 3, p. 195–205, 2009.

CURRIE-FRASER E, SHAH P, TRUE S. Data analysis using GeneMapper® v4.1: Comparing the Newest Generation of GeneMapper Software to Legacy Genescan® and Genotyper® Software. **J Biomol Tech.** 2010 Sep;21(3 Suppl):S31. PMID: PMC2918126.

DA SILVA SOUSA, R.P.; COSTA, W.S.; MATOS, P.E.S.; CARVALHO, A.S.; MARTINS, F.D.; TORRES, K.R. Ornamental potential of species from the ferruginous Campo rupestre of the Carajás National Forest, **Brazilian Amazon. Comun. Sci.** 2012, 12, e3260.

FRANKHAM, R. ET AL. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 2008. 280 p.

GIVNISH, T.J.; BARFUSS, M.H.J.; EE, B.V.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P.A.; JABAILY, R.S.; CRAYN, D.M.; SMITH, J.A.C.; et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eightlocus plastid phylogeny. **Am. J. Bot.** 2011, 98, 872–895.

HEDRICK, P.W. Genetics of Populations. 3rd ed. **Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.** 2005. 736p

HMELJEVSKI KV, REIS A, MONTAGNA T, REIS MS (2011) Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from southern Brazil. *Conserv Genet* 12:761-769

IZQUIERDO LY, PIÑERO D (2000) High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Aust J Bot* 48:645-650.

JULIANA MARCIA ROGALSKI, MAURÍCIO SEDREZ REIS, ADEMIR REIS ET AL. Demographic structure across all known populations of the rheophyte *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae) in the Itajaí-Açú River, Southern Brazil, 04 November 2022, PREPRINT (Version 1) available at **Research Square** [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2213650/v1>]

LAVOR P, VAN DEN BERG C, JACOBI CM, CARMO FF, VERSIEUX LM (2014) Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. **Am J Bot** 101(7):1167-1175

LEXER C, MARTHALER F, HUMBERT S, BARBARÁ T, DE LA HARPE M, BOSSOLINI E, PARIS M, MARTINELLI G, VERSIEUX LM (2016) Gene flow and diversification in a species complex of *Alcantarea inselberg* bromeliads. **Bot J Linn Soc** 181(3): 505-520.

LOBO, G.M.; DE SOUZA, T.V.; VOLTOLINI, C.H.; REIS, A.; SANTOS, M. Leaf epidermis of the rheophyte *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae). *Sci. World J.* 2013, 2013, 307593.

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. New York: **Columbia University Press.** 1987. 512p

NEI, M.; ROYCHOUDHURY, A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. **Genetics**, v.76, p.379-390, 1974.

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

PALMA-SILVA C, CAVALLARI MM, BARBARÁ T, LEXER C, GIMENES MA, BERED F, BODANESEZANETTINI MH (2007) 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.

PENG, Y. Q., FAN, L. L., MAO, F. Y., ZHAO, Y. S., XU, R., YIN, Y. J., CHEN, X., WAN, G., ZHANG, X. H. (2018). Genetic diversity and population structure of a protected species: *Polygala tenuifolia* Willd. **Comptes Rendus Biologies**, 341, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2018.01.007>

PEREIRA AG, BERNARDI UCS, MANHÃES VC, FERREIRA RS, MIRANDA FD (2017) Crossamplification and characterization of microsatellite markers in *Alcantarea patriae* Versieux & Wand. **Genet Mol Res** 16(2): gmr16029692.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Coservação**. Londrina: ISBN, 328 p., 2001.

ROGALSKI JM, REIS A, ROGALSKI M, MONTAGNA T, REIS MS (2017) Mating system and genetic structure across all known populations of *Dyckia brevifolia*: a clonal, endemic, and endangered rheophyte Bromeliad. **J Hered** 108:299–307.

SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D.P.; MONTEIRO, R.F.; PITA, P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R.C. Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? **Flora** 2013, 208, 508–521.

SARTHOU, C. ET AL. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geykesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. **Am J Bot** 88:861-868, 2001.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** 18: 233-234, 2000.

SOARES LE, GOETZE M, ZANELLA CM, BERED F (2018) Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. **Genet Mol Biol** 41(1): 308-317.

SOLÓRZANO, S., SOLÍS, S. J., & DÁVILA, P. (2010). Low Genetic Diversity in *Tillandsia recurvata* (Bromeliaceae), the Most Ubiquitous Epiphyte Species of the Semiarid and Arid Zones of North America. **Journal of the Bromeliad Society**, 60, 71-81.

WANG, X.; WANG, L. GMATA: an integrated software package for genome-scale SSR mining, marker development and viewing. 2016. **Frontiers in Plant Science** 7, doi 10.3389/fpls.2016.01350

ZANELLA, C. M. ET AL. Genetic evolution and conservation of Bromeliaceae. Porto Alegre: **Genetics and Molecular Biology**, v. 4, n. 35, p 1020-1026, 2012.

Considerações Finais e Perspectivas

Os resultados do presente trabalho representam avanços expressivos na área de sequenciamento de genomas plastidiais em bromélias. Primeiramente, foi sequenciado, montado e anotado pela primeira vez o genoma plastidial de uma espécie do gênero *Dyckia*. A partir disso, possibilitou-se o conhecimento da configuração dos genes revelando a existência de semelhanças entre os plastomas de espécies da subfamília *Puyoideae*, assim como do gênero *Ananas*. O plastídeo de *D. brevifolia* tem um comprimento de 159552 pb, com um teor de GC de 37% com um total de 95 genes, incluindo 59 genes codificadores de tRNA e 8 genes codificadores de rRNA previstos. Além disso, um total de 279 sítios de edição de RNA foram preditos em 40 genes do plastoma de *D. brevifolia* Baker.

A árvore filogenética construída a partir dos dados obtidos e comparados neste estudo fornece suporte para entender a relação entre os gêneros *Dyckia* com *Puya*. Visto que este último não está mais entre a subfamília Pitcairnoideae, os dados aqui indicam que o gênero *Dyckia* pode estar relacionado a nova subfamília *Puyoideae*. Embora dados filogenômicos de uma amostragem maior de espécies do gênero *Dyckia* seja necessário para corroborar essa hipótese.

Adicionalmente, a partir dos dados obtidos com o sequenciamento foram desenvolvidos 9 marcadores microssatélites que, em média, apresentaram moderado a alto número de alelos, com exceção do marcador MK206. Além disso, os marcadores desenvolvidos aqui demonstraram alta capacidade de diferenciar corretamente indivíduos coletados ao acaso dentro de uma população, com baixa probabilidade de erro. Contudo, a necessidade de prospecção de mais marcadores foi destacada, uma vez que existem ainda muitas regiões SSR que foram prospectadas, mas não foram validadas.

Este trabalho possui uma fragilidade em questão de análise da diversidade genética das populações, uma vez que o baixo número de indivíduos utilizados na validação na bancada foram reduzidos devido às enchentes que ocorreram no local onde se encontram as populações. Entretanto, o objetivo final deste estudo foi validar os marcadores microssatélites.

Com relação às perspectivas futuras, os marcadores genéticos aqui desenvolvidos precisam ser otimizados e ampliados para um número amostral maior de indivíduos.

Assim como realizar os testes de transferibilidade para espécies próximas da família Bromeliaceae.