



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Joana Nascimento Oliveira Zeist

**Sequenciamento parcial do genoma, análise evolutiva do plastoma e desenvolvimento  
de marcadores SSR em *Dyckia ibiramensis* (Reitz), Bromeliaceae**

Florianópolis - SC  
2024

Joana Nascimento Oliveira Zeist

**Sequenciamento parcial do genoma, análise evolutiva do plastoma e desenvolvimento de marcadores SSR em *Dyckia ibiramensis* (Reitz), Bromeliaceae**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestra em ciências.

Orientadora: Dr. Valdir Marcos Stefenon

Coorientador: Dr. Tiago Montagna

Florianópolis - SC

2024

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

Zeist, Joana Nascimento Oliveira

Sequenciamento parcial do genoma, análise evolutiva do plastoma e desenvolvimento de marcadores SSR em *Dyckia ibiramensis* (Reitz), Bromeliaceae / Joana Nascimento Oliveira Zeist ; orientador, Valdir Marcos Stefenon, coorientador, Tiago Montagna, 2024.

85 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. Conservação genética. 3. Genoma plastidial. 4. Marcadores SSR. 5. Variabilidade genética. I. Stefenon, Valdir Marcos . II. Montagna, Tiago . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Joana Nascimento Oliveira Zeist

**Sequenciamento parcial do genoma, análise evolutiva do plastoma e desenvolvimento de marcadores SSR em *Dyckia ibiramensis* (Reitz), Bromeliaceae**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 13 de setembro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Valdir Marcos Stefenon, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Leocir José Welter, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Maurício Sedrez dos Reis, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Juliana Marcia Rogalski, Dra.  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

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. Valdir Marcos Stefenon, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2024.

*À minha filha, Sarah Oliveira Zeist,*

*Este trabalho é dedicado a ti, minha pequena. Sua presença, mesmo em seus primeiros dias de vida, foi a força que me impulsionou a concluir este mestrado. Cada conquista aqui registrada é um tributo ao amor e à força que você trouxe para a minha vida. Que este esforço sirva como exemplo de que, com amor e dedicação, somos capazes de superar qualquer desafio. Que você sempre se orgulhe desta jornada e que ela te inspire a perseguir seus próprios sonhos, com a mesma coragem e determinação.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força e perseverança que me concedeu em todos os momentos destes dois anos e meio de mestrado.

Ao meu orientador, Valdir Stefenon, pela orientação, paciência, apoio, compreensão e por acreditar no meu potencial. Sua sabedoria e experiência foram importantes para a realização deste trabalho. E ao meu coorientador, Tiago Montagna, pela inestimável confiança em mim depositada para desenvolver este trabalho tão valioso. Foi verdadeiramente um presente.

Um agradecimento muito especial ao meu marido, André Zeist, e à minha filha, Sarah. É por vocês que hoje termino este mestrado. André, seu apoio incondicional, paciência e amor foram essenciais para que eu pudesse seguir em frente. Sarah, sua presença trouxe um novo sentido à minha vida e foi a força para que eu seguisse adiante.

Aos meus pais, em especial minha mãe, que veio de longe para me ajudar quando mais precisei. Seu amor e dedicação foram o que eu precisava para que eu pudesse me concentrar nos meus estudos.

Aos colegas que me ajudaram a terminar os trabalhos de laboratório durante minha gestação e pós-parto: Liana, Dani, Cassiano, Juliana, Ana, Yohan, Tales, Lilian e aos demais do grupo, pela compreensão e apoio. Cada um de vocês contribuiu para que eu pudesse alcançar este objetivo.

Agradeço também à FAPESC e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa, respectivamente, que possibilitaram a continuidade deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade e pelos recursos disponibilizados para a realização deste mestrado. A infraestrutura e o ambiente acadêmico foram valiosos para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste mestrado, direta ou indiretamente. Cada gesto de apoio e cada palavra de incentivo foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

## RESUMO GERAL

*Dyckia ibiramensis* é uma espécie endêmica e criticamente ameaçada do sul do Brasil, adaptada a ambientes extremos e sob crescente ameaça, devido à pressão antrópica. Esta dissertação teve como objetivo a caracterização genética de *D. ibiramensis*, incluindo a análise parcial do genoma nuclear e total do genoma plastidial, bem como o desenvolvimento e validação de marcadores microssatélites. A dissertação foi organizada em dois capítulos, cada um abordando diferentes aspectos da biologia da espécie. No primeiro capítulo, realizou-se o sequenciamento parcial do genoma e a caracterização genômica de *D. ibiramensis* utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração MinION Oxford Nanopore. A montagem parcial do genoma nuclear resultou na identificação de 3.734 genes, com um conteúdo de GC de 45,71%. O plastoma foi completamente montado, demonstrando uma estrutura quadripartite típica, composta por 125 genes. A análise dos elementos repetitivos mostrou que os retroelementos LTR são os mais prevalentes, representando 14,74% do genoma parcial. Estes achados fornecem uma base genômica para entender a biologia e a ecologia de *D. ibiramensis*, além de oferecer subsídios importantes para estratégias de conservação da espécie. O segundo capítulo focou no desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir dos dados genômicos obtidos. Foram identificados 33.112 loci de microssatélites, dos quais 10 foram selecionados e validados em 30 amostras representativas de subpopulações naturais de *D. ibiramensis*. A validação desses marcadores demonstrou uma alta variabilidade genética entre os loci, com 93% da variação genética concentrada dentro dos indivíduos. Este resultado sugere uma elevada diversidade genética intraindividual, fundamental para a sobrevivência da espécie em ambientes extremos. Adicionalmente, foram encontradas evidências de gargalos populacionais, possivelmente associados a antigos eventos climáticos extremos, destacando a vulnerabilidade da espécie e a necessidade urgente de medidas conservacionistas. Como conclusão, os resultados obtidos nesta dissertação indicam que *D. ibiramensis* possui uma diversidade genética significativa, especialmente dentro dos indivíduos, o que pode ser relevante para sua sobrevivência em ambientes adversos. No entanto, a contínua pressão antrópica coloca a espécie em risco, levando à necessidade de intervenções de conservação imediatas. Os marcadores microssatélites desenvolvidos não apenas fornecem ferramentas para futuros estudos de diversidade genética, mas também poderão ser utilizados para monitorar e manejar as populações de *D. ibiramensis*, contribuindo para a conservação de espécies endêmicas ameaçadas.

**Palavras-chave:** Conservação genética; genoma plastidial; genômica; marcadores SSR; seleção de marcadores; variabilidade genética.

## GENERAL ABSTRACT

*Dyckia ibiramensis* is an endemic and critically endangered species from southern Brazil, adapted to extreme environments and increasingly threatened by anthropogenic pressures. This dissertation aimed at sequencing the partial genome and provide a comprehensive genetic characterization of *D. ibiramensis*, including the analysis of its partial nuclear genome and the whole plastidial genome, as well as the development and validation of microsatellite markers. The dissertation is organized into two chapters, each addressing different aspects of the species' biology. In the first chapter, the sequencing and the genomic characterization of *D. ibiramensis* was performed using Oxford Nanopore's MinION next-generation sequencing technology. The partial assembly of the nuclear genome resulted in the identification of 3,734 genes, with a GC content of 45.71%. The plastome was fully assembled, showing a typical quadripartite structure, comprising 125 genes. The analysis of repetitive elements revealed that LTR retroelements are the most prevalent, representing 14.74% of the partial genome. These findings provide a genomic basis for understanding the biology and ecology of *D. ibiramensis*, as well as offering important insights for the species' conservation strategies. The second chapter focused on the development of microsatellite markers from the genomic data obtained. A total of 33,112 microsatellite loci were identified, from which 10 were selected and validated in 30 representative samples of natural subpopulations of *D. ibiramensis*. The validation of these markers demonstrated high genetic variability among loci, with 93% of the genetic variation concentrated within individuals. This result suggests a high level of intraindividual genetic diversity, which is crucial for the species' survival in extreme environments. Additionally, evidence of population bottlenecks was found, possibly associated with ancient extreme climatic events, highlighting the species' vulnerability and the urgent need for conservation measures. In conclusion, the results obtained in this dissertation indicate that *D. ibiramensis* possesses significant genetic diversity, especially within individuals, which may be relevant for its survival in adverse environments. However, the continuous anthropic pressure leads the species at risk, requiring immediate conservation interventions. The microsatellite markers developed not only provide tools for future studies on genetic diversity but may also be used to monitor and manage populations of *D. ibiramensis*, contributing to the conservation of endangered endemic species.

**Keywords:** Genetic conservation; genetic variability; genomics; marker selection; plastid genome; SSR markers.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>3. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>12</b>
<b>4. CAPÍTULO I. SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA NUCLEAR PARCIAL E DO PLASTOMA COMPLETO DE <i>Dyckia ibiramensis</i> REITZ .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Introdução .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Material e Métodos .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3 Resultados .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4 Discussão .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 Conclusões .....</b>	<b>46</b>
<b>4.6 Referências .....</b>	<b>47</b>
<b>5. CAPÍTULO II. MARCADORES MOLECULARES E ELEMENTOS REPETITIVOS EM <i>DYCKIA IBIRAMENSIS</i>, UMA ESPÉCIE ENDÊMICA.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Introdução .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2. Material e Métodos .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3 Resultados .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4 Discussão .....</b>	<b>69</b>
<b>5.5 Conclusão .....</b>	<b>74</b>
<b>5.6. Referências .....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os Neotrópicos, ou América Tropical, são reconhecidos como um "centro de biodiversidade", abrigando a maior floresta tropical e uma vasta quantidade de espécies da flora mundial (ANTONELLI, 2022). Apesar dos esforços significativos, as informações sobre a distribuição e diversidade de plantas ainda são escassas em comparação aos animais, especialmente no que se refere a espécies não arbóreas (ZIZKA et al., 2020). Essas lacunas são ainda mais evidentes em estudos que buscam compreender a macroecologia e macroevolução nos Neotrópicos.

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. pertence à família Bromeliaceae e é encontrado principalmente na América do Sul, compreendendo cerca de 220 espécies conhecidas, pertencentes à subfamília Pitcairnioideae (ANTAR et al., 2021). As espécies de *Dyckia* estão distribuídas em vegetações xerófitas ao longo da América do Sul, desde o norte da Argentina até o nordeste do Brasil, destacando-se pela diversidade nos biomas Cerrado e Caatinga (ANTAR et al., 2021). Esse gênero apresenta um nível significativo de endemismo, com muitas espécies restritas a localidades específicas, como montanhas ou formações rochosas (GOMES-DA-SILVA; SANTOS-SILVA; FORZZA, 2019a).

A bromélia *Dyckia ibiramensis* é rara e endêmica do sul do Brasil, encontrada no município de Ibirama, Santa Catarina, ocupando uma área de aproximadamente 2 km ao longo do Rio Itajaí-açu. Esta espécie é caracterizada como rupícola, heliófita e reófita, apresentando crescimento clonal vegetativo (HMELJEVSKI et al., 2011a; ROGALSKI et al., 2021). Em 2022, as listas do Ministério do Meio Ambiente (MMA) de espécies ameaçadas e o CNCFlora classificaram *D. ibiramensis* como "Em Perigo (EN)", enquanto na lista do Conselho Estadual de Meio Ambiente de Santa Catarina (CONSEMA) a classifica como "Críticamente Ameaçada (CR)".

As espécies de *Dyckia* são notáveis por sua capacidade de adaptação a ambientes extremos, incluindo altas temperaturas, secas prolongadas e inundações periódicas (KRAPP; EGGLI, 2020a). Essa adaptabilidade torna *D. ibiramensis* um modelo ideal para estudos sobre resistência a estresses ambientais e processos evolutivos que permitem a sobrevivência em condições adversas (FLOOD; HANCOCK, 2017). Estudos genômicos têm sido amplamente utilizados para caracterizar genes e rotas metabólicas de interesse biotecnológico, farmacêutico e agrônomo em espécies silvestres (STEFENON; SARZI; ROESCH, 2019), além de desenvolver marcadores moleculares (PETRY et al., 2019; SARZI et al., 2019).

Entre as rotas metabólicas de interesse, destaca-se aquelas relacionadas a respostas a estresses abióticos, principalmente devido ao avanço das mudanças climáticas (PANDE;

ARORA, 2017). O desenvolvimento de marcadores moleculares é uma importante ferramenta para a caracterização da diversidade e estrutura genética de populações silvestres, contribuindo para a conservação dessas espécies (PETRY et al., 2019; SARZI et al., 2019; STEFENON; SARZI; ROESCH, 2019).

Considerando o risco elevado de extinção que *Dyckia ibiramensis* enfrenta, conforme indicado nas listas de classificação de espécies ameaçadas, juntamente com a crescente pressão antrópica nas áreas onde suas populações ocorrem e a escassez de dados genéticos e genômicos disponíveis, torna-se indispensável o desenvolvimento de estudos focados nesse contexto. Informações genéticas fornecem dados sobre diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo gênico, enquanto dados genômicos permitem desenvolver marcadores moleculares e caracterizar genes relacionados a características evolutivas e adaptativas.

O avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitou um aumento significativo no número de estudos capazes de mapear variações genéticas adaptativas, identificar genes e rotas metabólicas de importância biotecnológica, agrônômica e farmacêutica em plantas não cultivadas (STEFENON; SARZI; ROESCH, 2019). Esses dados genômicos fornecem informações valiosas sobre evolução adaptativa, respostas a estresses ambientais e estratégias de conservação para espécies ameaçadas (SORK, 2018).

Além das análises genômicas nucleares, o estudo do genoma do cloroplasto é de particular importância para a compreensão da biologia de *D. ibiramensis*. O genoma cloroplastidial é uma molécula de DNA circular quadripartida, altamente conservada ao longo da evolução, sendo uma ferramenta valiosa em estudos evolutivos e filogenéticos (GAO et al., 2019; SABLOK et al., 2016). A montagem e anotação do genoma plastidial de *D. ibiramensis* são essenciais para fornecer informações sobre a fotossíntese e outras funções metabólicas (SANDOVAL-PADILLA et al., 2019; YANG; LI; ZHAO, 2019).

Os elementos repetitivos, incluindo retrotransposons e transposons, desempenham um papel significativo na estrutura e organização do genoma (RIBEIRO et al., 2020). Esses elementos são essenciais para a regulação gênica e integridade do genoma, além de serem úteis para o desenvolvimento de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética e conservação (PETRY et al., 2019).

Marcadores moleculares, como os microssatélites, são ferramentas poderosas para análises de variabilidade genética, estrutura populacional e desenvolvimento de estratégias de conservação. Eles são altamente polimórficos, codominantes e específicos de loci, permitindo análises detalhadas de variabilidade genética e estrutura populacional (SRIVASTAVA et al., 2019). Esses marcadores são particularmente úteis para espécies raras e ameaçadas, como *D.*

*ibiramensis*, fornecendo dados essenciais para estratégias de conservação (LEMOS et al., 2018).

Em resumo, este estudo visou a não apenas ampliar o conhecimento genético e genômico de *D. ibiramensis*, mas também contribuir para a conservação desta espécie endêmica e ameaçada. A integração de análises genômicas com abordagens de conservação pode fornecer informações detalhadas para a proteção de *D. ibiramensis* e de outras espécies semelhantes, promovendo a biodiversidade e a resiliência dos ecossistemas onde elas ocorrem.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a base genética de *Dyckia ibiramensis* por meio do sequenciamento parcial e da anotação de seu genoma total e plastidial, além do desenvolvimento de marcadores microssatélites, visando ampliar o conhecimento genômico e contribuir para a conservação desta espécie endêmica e ameaçada.

### 2.2 Objetivos Específicos

Gerar recursos genômicos para *D. ibiramensis*, por meio do sequenciamento parcial do seu genoma total, identificando genes e proteínas que possam estar relacionados com sua adaptabilidade ao ambiente, além de montar e anotar o genoma plastidial da espécie.

Por meio do sequenciamento parcial de baixa cobertura do genoma de *D. ibiramensis*, caracterizar o conteúdo de elementos repetitivos presentes no genoma e desenvolver marcadores microssatélites para a espécie.

## 3. REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, S. et al. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **The Nucleus**, v. 60, n. 3, p. 283–297, 1 dez. 2017.
- ANTAR, G. M. et al. Novelties in *Dyckia* (Pitcairnioideae - Bromeliaceae) from the South America dry diagonal: Two new species, a new combination and a new name. **Feddes Repertorium**, v. 132, n. 3, p. 269–278, 2021.
- ANTONELLI, A. The rise and fall of Neotropical biodiversity. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 199, n. 1, p. 8–24, 1 maio 2022.
- BAYLY, M. J. et al. Chloroplast genome analysis of Australian eucalypts – *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Angophora*, *Allosyncarpia* and *Stockwellia* (Myrtaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 704–716, 1 dez. 2013.

- BIGOT, S. et al. Pivotal roles of environmental sensing and signaling mechanisms in plant responses to climate change. **Global Change Biology**, v. 24, n. 12, p. 5573–5589, 2018.
- BOGAMUWA, S. P.; JANG, J.-C. Tandem CCCH zinc finger proteins in plant growth, development and stress response. **Plant & Cell Physiology**, v. 55, n. 8, p. 1367–1375, ago. 2014.
- BOOY, G. et al. Genetic Diversity and the Survival of Populations. **Plant Biology**, v. 2, n. 4, p. 379–395, 2000.
- CHAN, P. P.; LOWE, T. M. tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1962, p. 1–14, 2019.
- CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. The zinc finger network of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7, p. 1150–1160, 1 abr. 2008.
- COX, R. L.; UNDERWOOD, E. C. The Importance of Conserving Biodiversity Outside of Protected Areas in Mediterranean Ecosystems. **PLOS ONE**, v. 6, n. 1, p. e14508, 7 jan. 2011.
- DAR, A.; MAHAJAN, R.; SHARMA, S. Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 89, p. 1755–1763, 1 nov. 2019.
- DARLING, A. C. E. et al. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394–1403, jul. 2004.
- DAVIES, P. M. Climate Change Implications for River Restoration in Global Biodiversity Hotspots. **Restoration Ecology**, v. 18, n. 3, p. 261–268, 2010.
- DOBROGOJSKI, J.; ADAMIEC, M.; LUCIŃSKI, R. The chloroplast genome: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 6, p. 98, 18 maio 2020.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. (EDS.). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **PHYTOCHEMICAL BULLETIN**, [s.d.].
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FANG, J. et al. Genome-Wide Comparative Analysis of Microsatellites in Pineapple. **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 117–135, 1 set. 2016.
- FISCHER, M. C. et al. Estimating genomic diversity and population differentiation – an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 69, 11 jan. 2017.
- FLANAGAN, S. P. et al. Guidelines for planning genomic assessment and monitoring of locally adaptive variation to inform species conservation. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 7, p. 1035–1052, 2018.
- FLOOD, P. J.; HANCOCK, A. M. The genomic basis of adaptation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 36, p. 88–94, abr. 2017.

- FU, M. et al. OTP970 Is Required for RNA Editing of Chloroplast *ndhB* Transcripts in *Arabidopsis thaliana*. **Genes**, v. 13, n. 1, p. 139, jan. 2022.
- GAO, L.-Z. et al. Evolution of *Oryza* chloroplast genomes promoted adaptation to diverse ecological habitats. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 278, 26 jul. 2019.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. The Genomics of Plant Satellite DNA. Em: UGARKOVIĆ, Đ. (Ed.). **Satellite DNAs in Physiology and Evolution**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 103–143.
- GARZA, J. C.; WILLIAMSON, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 305–318, fev. 2001.
- GIVNISH, T. et al. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical Biogeography of Bromeliaceae Inferred from *ndhF* Sequence Data. **Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany**, v. 23, n. 1, p. 3–26, 1 dez. 2007.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872–895, 2011.
- GODOY, F. M. DE R. et al. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 187, n. 4, p. 672–688, 27 jul. 2018.
- GOMES, A. C. et al. Adaptive response of extreme epiphyte *Tillandsia* species (Bromeliaceae) is demonstrated by different sexual reproduction strategies in the Brazilian Chaco. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 4, p. 840–854, 27 mar. 2020.
- GOMES-DA-SILVA, J.; SANTOS-SILVA, F.; FORZZA, R. C. Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 5, p. 467–490, 4 jul. 2019a.
- GOMES-DA-SILVA, J.; SANTOS-SILVA, F.; FORZZA, R. C. Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 5, p. 467–490, 4 jul. 2019b.
- GONZÁLEZ-ASTORGA, J. et al. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 94, n. 4, p. 545–551, out. 2004.
- GOSSMANN, T. I. et al. Genome Wide Analyses Reveal Little Evidence for Adaptive Evolution in Many Plant Species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 8, p. 1822–1832, 1 ago. 2010.
- GÖTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 1 jun. 2008.
- GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290–302, 3 mar. 2016.

- HARRISSON, K. A. et al. Using genomics to characterize evolutionary potential for conservation of wild populations. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 9, p. 1008–1025, 2014.
- HASSAN, A. H.; MOKHTAR, M. M.; EL ALLALI, A. Transposable elements: multifunctional players in the plant genome. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 4 jan. 2024.
- HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6, p. 445–600, 1995.
- HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761–769, 1 jun. 2011a.
- HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761–769, 1 jun. 2011b.
- HORNUNG-LEONI, C. T. et al. Genetic variation in the emblematic *Puya raimondii* (Bromeliaceae) from Huascarán National Park, Peru. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 67–74, mar. 2013.
- HUNTER, J. The Matplotlib User's Guide. [s.d.].
- IGAMBERDIEV, A. U.; BYKOVA, N. V. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants. **Free Radical Biology and Medicine**, Redox Signalling in Plants and Implications for Mammalian Physiology. v. 122, p. 74–85, 1 jul. 2018.
- JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459–473, 2014.
- KRAPP, F. et al. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 12, p. e470–e473, 2012.
- KRAPP, F. et al. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 7, p. 1591–1614, 1 ago. 2014.
- KRAPP, F.; EGGLI, U. *Dyckia* BROMELIACEAE. Em: EGGLI, U.; NYFFELER, R. (Eds.). **Monocotyledons**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020a. p. 893–962.
- KRAPP, F.; EGGLI, U. *Dyckia* BROMELIACEAE. Em: EGGLI, U.; NYFFELER, R. (Eds.). **Monocotyledons**. Illustrated Handbook of Succulent Plants. Berlin, Heidelberg: Springer, 2020b. p. 893–962.
- KRASILEVA, K. V. The role of transposable elements and DNA damage repair mechanisms in gene duplications and gene fusions in plant genomes. **Current Opinion in Plant Biology**, Genome studies and molecular genetics. v. 48, p. 18–25, 1 abr. 2019.

LASLETT, D.; CANBACK, B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 11–16, 2004.

LEMOS, R. P. M. et al. Characterization of Plastidial and Nuclear SSR Markers for Understanding Invasion Histories and Genetic Diversity of *Schinus molle* L. **Biology**, v. 7, n. 3, p. 43, set. 2018.

LI, S. et al. The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 654–670, 2017.

LIN, J.; MING, R. Sequencing and Assembly of the Pineapple Genome. Em: MING, R. (Ed.). **Genetics and Genomics of Pineapple**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 97–107.

LIN, L.; SHARMA, A.; YU, Q. Recent amplification of microsatellite-associated miniature inverted-repeat transposable elements in the pineapple genome. **BMC Plant Biology**, v. 21, p. 424, 18 set. 2021.

LIU, J.; GUYOT, R.; MING, R. Transposable Elements in the Pineapple Genome. Em: MING, R. (Ed.). **Genetics and Genomics of Pineapple**. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 22p. 155–165.

LIU, L. et al. Draft genome of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the Queen of the Andes. **Genomics**, v. 113, n. 4, p. 2537–2546, 1 jul. 2021.

LOHSE, M. et al. OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W575-581, jul. 2013.

MAAGD, R. A. DE; WIEL, C. C. M. VAN DE; SCHOUTEN, H. J. **The plasticity of plant genomes : Causes and consequences: a survey of data on structural genome variation in plants**. Bilthoven: Cogem, 2020. Disponível em: <<https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/575389>>. Acesso em: 7 jul. 2024.

MACKEH, R. et al. C2H2-Type Zinc Finger Proteins: Evolutionarily Old and New Partners of the Nuclear Hormone Receptors. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 15, p. 1550762918801071, 2018.

MCKINNEY, W. **Data Structures for Statistical Computing in Python**. . Em: PYTHON IN SCIENCE CONFERENCE. Austin, Texas: 2010. Disponível em: <<https://conference.scipy.org/proceedings/scipy2010/mckinney.html>>. Acesso em: 25 jun. 2024

MHIRI, C.; BORGES, F.; GRANDBASTIEN, M.-A. Specificities and Dynamics of Transposable Elements in Land Plants. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 488, 23 mar. 2022.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, jan. 2006.

MOUGA, D. M. D. DA S. et al. Pollinic characterization of *Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae), *Dyckia brevifolia* Baker and *Dyckia ibiramensis* Reitz (Bromeliaceae), reophyte



and saxicolous endemic species of river Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brazil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 4, n. 1, p. 71–82, 29 jun. 2017.

MURAT, F.; PEER, Y. V. DE; SALSE, J. Decoding Plant and Animal Genome Plasticity from Differential Paleo-Evolutionary Patterns and Processes. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 9, p. 917–928, 1 jan. 2012.

OLIVEIRA DE OLIVEIRA, L. et al. Molecular markers in *Carya illinoensis* (Juglandaceae): from genetic characterization to molecular breeding. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 560–569, 3 set. 2021.

OROZCO-ARIAS, S.; ISAZA, G.; GUYOT, R. Retrotransposons in Plant Genomes: Structure, Identification, and Classification through Bioinformatics and Machine Learning. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3837, jan. 2019.

PANDE, A.; ARORA, S. Molecular Strategies for Development of Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Cell & Cellular Life Sciences Journal**, v. 2, 31 jul. 2017.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PETRY, V. S. et al. Repetitive genomic elements in *Campomanesia xanthocarpa*: prospection, characterization and cross amplification of molecular markers. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 423, 28 out. 2019.

PINANGÉ, D. S. B. et al. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 1, p. 39–56, 1 jan. 2017a.

PINANGÉ, D. S. B. et al. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 1, p. 39–56, 1 jan. 2017b.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.-M. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502–503, 1 jul. 1999.

RAUWERDINK, A.; KAZLAUSKAS, R. J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Fold Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 10, p. 6153–6176, 2 out. 2015.

REHMAN, S.; MAHMOOD, T. Functional role of DREB and ERF transcription factors: regulating stress-responsive network in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 9, p. 178, 8 ago. 2015.

RIBEIRO, T. et al. Diversity of repetitive sequences within compact genomes of *Phaseolus* L. beans and allied genera *Cajanus* L. and *Vigna* Savi. **Chromosome Research**, v. 28, n. 2, p. 139–153, 1 jun. 2020.

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, 1 maio 2017.

- ROGALSKI, J. M. et al. Demographic structure of clonal, endemic, and endangered rheophyte bromeliad *Dyckia ibiramensis*: asexual vs sexual reproduction. **Rodriguésia**, v. 72, p. e00752020, 3 dez. 2021.
- ROLLAND, N. et al. The Biosynthetic Capacities of the Plastids and Integration Between Cytoplasmic and Chloroplast Processes. **Annual Review of Genetics**, v. 46, n. 1, p. 233–264, 2012.
- ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 248–249, 2008.
- ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 1 dez. 2017.
- SABLOK, G. et al. Chloroplast genomics: Expanding resources for an evolutionary conserved miniature molecule with enigmatic applications. **Current Plant Biology**, v. 7–8, p. 34–38, nov. 2016.
- SAHEBI, M. et al. Contribution of transposable elements in the plant's genome. **Gene**, v. 665, p. 155–166, jul. 2018.
- SANDOVAL-PADILLA, I. et al. Complete sequence of wild *Physalis philadelphica* chloroplast genome. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 3295–3297, 3 jul. 2019.
- SARZI, D. S. et al. Discovery and characterization of SSR markers in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) using low coverage genome sequencing. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20180420, 8 abr. 2019.
- SATO, N. Complex origins of chloroplast membranes with photosynthetic machineries: multiple transfers of genes from divergent organisms at different times or a single endosymbiotic event? **Journal of Plant Research**, v. 133, n. 1, p. 15–33, jan. 2020.
- SATO, N. Are Cyanobacteria an Ancestor of Chloroplasts or Just One of the Gene Donors for Plants and Algae? **Genes**, v. 12, n. 6, p. 823, 27 maio 2021.
- SAUGUET, L. The Extended “Two-Barrel” Polymerases Superfamily: Structure, Function and Evolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 20, p. 4167–4183, 20 set. 2019.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, fev. 2000.
- SCHULTE, K. et al. Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 3, p. 1105–1119, 1 dez. 2010.
- SCHÜTZ, N. et al. Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 323–342, 1 jul. 2016.
- SHCHERBAN, A. B. Repetitive DNA sequences in plant genomes. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 5, n. 3, p. 159–167, 1 maio 2015.

- SHEIKH-ASSADI, M. et al. Complete chloroplast genome of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss and its comparative analysis: lights into selective pressure and adaptive evolution. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9375, 7 jun. 2022.
- SHEU, Y. et al. Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.
- SOARES, L. E. et al. Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 1 Suppl 1, p. 308–317, 2018.
- SONG, Y. et al. Function of Chloroplasts in Plant Stress Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13464, jan. 2021.
- SORK, V. L. Genomic Studies of Local Adaptation in Natural Plant Populations. **Journal of Heredity**, v. 109, n. 1, p. 3–15, 1 jan. 2018.
- SRIVASTAVA, S. et al. Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 153, dez. 2019.
- STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl\_2, p. W465–W467, 1 jul. 2005.
- STEFENON, V. M.; SARZI, D. S.; ROESCH, L. F. W. High-throughput sequencing analysis of *Eugenia uniflora*: insights into repetitive DNA, gene content and potential biotechnological applications. **3 Biotech**, v. 9, n. 5, p. 200, 3 maio 2019.
- THE GALAXY COMMUNITY. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W345–W351, 5 jul. 2022.
- TILLICH, M. et al. GeSeq – versatile and accurate annotation of organelle genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W6–W11, 3 jul. 2017.
- TYAGI, S. et al. Codon Usage Provide Insights into the Adaptation of Rice Genes under Stress Condition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1098, jan. 2023.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115–e115, ago. 2012.
- VAN OOSTERHOUT, C. et al. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.
- WAMBUGU, P. W.; NDJIONDJOP, M.-N.; HENRY, R. J. Role of genomics in promoting the utilization of plant genetic resources in genebanks. **Briefings in Functional Genomics**, v. 17, n. 3, p. 198–206, 1 maio 2018.
- WANG, X.; WANG, L. GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 13 set. 2016.

WREGE, M. S. et al. **Atlas climático da Região Sul do Brasil - Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: [s.n.]. v. 1

XU, J.; WANG, N. Where are we going with genomics in plant pathogenic bacteria? **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 729–736, 1 jul. 2019.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781–803, 2006.

YANG, L.; LI, Q.; ZHAO, G. Characterization of the complete chloroplast genome of *Chenopodium* sp. (Caryophyllales: Chenopodiaceae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2574–2575, 3 jul. 2019.

YAO, X. et al. Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China. **New Phytologist**, v. 176, n. 2, p. 472–480, 2007.

YEAMAN, S. et al. Conservation and divergence of gene expression plasticity following c. 140 million years of evolution in lodgepole pine (*Pinus contorta*) and interior spruce (*Picea glauca* × *Picea engelmannii*). **New Phytologist**, v. 203, n. 2, p. 578–591, 2014.

YOUNIS, A. et al. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1374, out. 2020.

ZANELLA, C. M. et al. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1020–1026, 2012.

ZHAN, J.; MEYERS, B. C. Plant Small RNAs: Their Biogenesis, Regulatory Roles, and Functions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 74, n. Volume 74, 2023, p. 21–51, 22 maio 2023.

ZHANG, F. et al. The nature and genomic landscape of repetitive DNA classes in *Chrysanthemum nankingense* shows recent genomic changes. **Annals of Botany**, v. 131, n. 1, p. 215–228, 1 jan. 2023.

ZHANG, Y. et al. The Role of Chloroplast Gene Expression in Plant Responses to Environmental Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6082, jan. 2020.

ZIESCHANK, V.; MUOLA, A.; JUNKER, R. R. **Tolerance to land-use changes through natural modulations of the plant microbiome**. bioRxiv, , 13 nov. 2023. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.11.13.566857v1>>. Acesso em: 5 mar. 2024

ZIZKA, A. et al. Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). **Diversity and Distributions**, v. 26, n. 2, p. 183–195, 2020.

#### **4. CAPÍTULO I. SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA NUCLEAR PARCIAL E DO PLASTOMA COMPLETO DE *Dyckia ibiramensis* REITZ**

##### **Resumo**

O presente estudo teve como focos o sequenciamento parcial, montagem e anotação do genoma nuclear de *Dyckia ibiramensis* Reitz, bem como a montagem e anotação do plastoma e estudos de relações evolutivas e filogenéticas dessa espécie endêmica e criticamente ameaçada do sul do Brasil. Com o objetivo de investigar a base genética de sua adaptabilidade e sobrevivência em um ambiente extremo, utilizou-se tecnologias de sequenciamento de nova geração para analisar tanto o genoma nuclear quanto o plastidial da espécie. Os métodos incluíram isolamento de DNA, sequenciamento usando a plataforma Oxford Nanopore, e análises subsequentes de montagem e anotação genômica. Os resultados sugerem uma alta complexidade genética de *D. ibiramensis* com a predição de 3.734 genes. O conteúdo de GC foi de 45,71%, e a montagem do plastoma revelou estruturas conservadas e genes essenciais para a resposta ao estresse e fotossíntese. Este estudo expande o entendimento da genética de *D. ibiramensis*, destacando a importância de estratégias genômicas para a conservação de espécies ameaçadas, oferecendo perspectivas para a exploração biotecnológica de suas características únicas de adaptabilidade.

**Palavras-chave:** Adaptabilidade genética, Análise de plastoma, Conservação de espécies, Metabolismo e fotossíntese, Sequenciamento de nova geração, Tolerância ao estresse.

#### **SEQUENCING, ASSEMBLY, AND ANNOTATION OF THE PARTIAL NUCLEAR GENOME AND WHOLE PLASTOME OF *Dyckia ibiramensis* REITZ**

##### **Abstract**

This study focused on the partial sequencing, assembly, and annotation of the nuclear genome of *Dyckia ibiramensis* Reitz, as well as the assembly and annotation of its plastome and studies of evolutionary and phylogenetic relationships of this critically endangered endemic species from southern Brazil. Aiming to investigate the genetic basis of its adaptability and survival in an extreme environment, next-generation sequencing technologies were employed to analyze both the nuclear and plastid genomes of the species. The methods included DNA isolation, sequencing using the Oxford Nanopore platform, and subsequent genomic assembly and annotation analyses. The results suggest a high genetic complexity of *D. ibiramensis* with the prediction of 3,734 genes. The GC content was 45.71%, and the plastome assembly revealed

conserved structures and essential genes for stress response and photosynthesis. This study expands the understanding of the genetics of *D. ibiramensis*, highlighting the importance of genomic strategies for the conservation of endangered species and offering perspectives for the biotechnological exploration of its unique adaptability traits.

**Keywords:** Genetic adaptability, Plastome analysis, Species conservation, Metabolism and photosynthesis, Next-generation sequencing, Stress tolerance.

#### 4.1 Introdução

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult.f pertence à família Bromeliaceae e à subfamília Pitcairnioideae, com cerca de 172 espécies conhecidas (GOMES-DA-SILVA; SANTOS-SILVA; FORZZA, 2019b). É constituído tipicamente de espécies xerófitas de vegetação rochosa, distribuído majoritariamente na América do Sul, em uma região que se estende do norte da Argentina ao nordeste do Brasil (ANTAR et al., 2021), sendo os Campos Rupestres brasileiros considerados como centro de biodiversidade deste gênero, especificamente os estados de Minas Gerais e Bahia (KRAPP; EGGLI, 2020b). É um gênero que possui microendemismo e espécies restritas a certas localidades, como cordilheiras ou bancos rochosos. Devido à distribuição restrita de algumas espécies, essas são sujeitas a certo grau de ameaça, principalmente por causas antrópicas (PINANGÉ et al., 2017a).

*Dyckia ibiramensis* Reitz é endêmica do sul do Brasil, com distribuição restrita a dois quilômetros em bancos rochosos às margens do rio Itajaí do Norte no município de Ibirama no estado de Santa Catarina. É considerada uma espécie rupícola e reófito, podendo chegar a um metro de comprimento. Sua alta adaptação às variações extremas do ambiente chama atenção, por viver em períodos de enchentes e vazantes (REITZ, 1983) – sobretudo, causada pelas barragens locais (ROGALSKI et al., 2021) – e períodos de estiagem.

A década de 1980 foi marcada por sucessivas inundações na região de Ibirama, que impactaram a espécie, levando-a a ser classificada como Criticamente Ameaçada, pela Lista Oficial das Espécies Ameaçadas da Flora Brasileira (HMELJEVSKI et al., 2011b), e atualmente está classificada como Em Perigo (MMA, 2022). Além disso, três populações dessa espécie foram extintas, em 2004, devido ao alagamento, provocado pela construção de uma pequena central hidrelétrica (Ibirama energética S.A) no rio Itajaí do Norte, a montante da área de ocorrência de *D. ibiramensis* (HMELJEVSKI et al., 2011b). Por mais, as fortes chuvas e alagamentos ocorridos no final do ano de 2023 causaram um novo impacto negativo sobre as populações dessa espécie, restando menos duas mil rosetas em toda sua área de ocorrência.

O avanço de novas tecnologias genômicas possibilitou um aumento no número de estudos capazes de mapear variações genéticas adaptativas, identificação de genes e rotas metabólicas (SORK, 2018), com possível importância biotecnológica, agrônômica e até farmacêutica em plantas não cultivadas (STEFENON et al., 2019). Essas informações genômicas enriquecem os estudos, pois fornecem dados mais aprimorados, por exemplo, sobre evolução adaptativa, respostas à estresses ambientais e meios de gerenciamento das estratégias de conservação de espécies ameaçadas ou em risco (SORK, 2018). Muitas dessas análises são possibilitadas, devido as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), que permite a obtenção de sequenciamentos parciais do genoma total (nuclear e organelar), gerando grandes oportunidades de integrar dados sobre espécies não-modelo ou não cultivadas (FLANAGAN et al., 2018; SARZI et al., 2019).

A análise desses dados genômicos é enriquecida com estudos dos cloroplastos. O genoma cloroplastidial se apresenta como uma molécula circular de DNA quadripartite, sendo uma região grande de cópia única (LSC), uma pequena de cópia única (SSC) e duas regiões de repetição invertida (IRa e IRb). Os cloroplastos são amplamente aceitos como tendo origem endossimbiótica a partir de cianobactérias. No entanto, estudos recentes sugerem que embora os componentes primários da fotossíntese e a expressão gênica dessas organelas tenham uma origem comum com as cianobactérias, outras vias Biosintéticas e enzimáticas parecem ter uma origem diferente. Isso sugere uma possível origem quimérica dos cloroplastos, dado o alto grau de fluxo gênico encontrado em filogenias (SATO, 2020, 2021). Essa é uma estrutura com uma notável conservação ao longo da evolução, sendo uma ferramenta em estudos evolutivos (GAO et al., 2019; SABLOK et al., 2016) e de filogenia (SANDOVAL-PADILLA et al., 2019; YANG; LI; ZHAO, 2019).

A realização de um estudo genômico sobre a *D. ibiramensis* é de extrema relevância, visto que há importante escassez dessas informações. Com esses dados mais detalhados torna-se possível a obtenção de informações sobre a estrutura genética da espécie, diversidade, evolução e adaptação ao ambiente. Além disso, a genômica também pode revelar genes e vias metabólicas relacionados as características de tolerância a estresses. Em base disso, o principal objetivo deste trabalho foi gerar recursos genômicos para *D. ibiramensis*, por meio do sequenciamento parcial do seu genoma nuclear, identificando genes e proteínas que possam estar relacionados com sua adaptabilidade ao ambiente, além de montar e anotar o genoma plastidial da espécie.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1 Coleta de material

Foram coletadas amostras foliares de uma planta adulta em uma população natural em Ibirama-SC (27°02'20''S, 49°33'46''W ~224m) (Figura 1). A região apresenta clima subtropical úmido, com verões quentes, temperatura média anual entre 18 e 20°C e umidade relativa do ar média entre 82 e 84%, tendendo nos meses de inverno a umidade ser mais baixa (WREGE et al., 2012). Uma exsicata da espécie foi depositada no herbário Flor, da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número de tombo FLOR 79881.



Figura 1. Registro fotográfico de *Dyckia ibiramensis* em seu habitat natural, Ibirama, Santa Catarina, Brasil.

### 4.2.2 Isolamento do DNA e sequenciamento

O DNA total foi isolado de folhas saudáveis, através do método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987). A quantidade e a qualidade do DNA isolado foram verificadas através do espectrofotômetro NanoDrop 1000<sup>®</sup>, em relação a concentração e razões de absorbância 260/280 e 260/230 e do fluorômetro Qubit<sup>®</sup>. 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. Para o sequenciamento do genoma da espécie, a preparação da biblioteca genômica foi realizada utilizando o Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 e SQK-LSK112. O sequenciamento utilizou o sistema Oxford Nanopore Technologies MinION Mk1B em flowcells R9.1 para o kit SQK-LSK109 e R10.1 para o kit SQK-LSK112. O *basecalling* foi realizado através do software Guppy, o programa PORECHOP foi utilizado para a limpeza das sequências e a montagem dos *contigs* foram realizadas com o software FLYE. O software REDUNDANS foi utilizado para remover *contigs* repetidos, devido à heterozigosidade. Tanto os dados brutos quanto os *contigs* foram depositados no BioProject PRJNA872198, BioSample SAMN30448151, no banco de dados do GenBank/NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/?term=Dyckia+ibiramensis>).

#### 4.2.3 Caracterização da montagem e predição de genes

A qualidade da montagem foi avaliada utilizando o software Quast, e a predição de genes foi realizada com o Augustus (STANKE; MORGENSTERN, 2005), usando *Zea mays* como modelo de referência. Ambas análises foram conduzidas na plataforma Galaxy (THE GALAXY COMMUNITY, 2022). Adicionalmente, o pacote OmicsBox (GÖTZ et al., 2008) foi utilizado para as análises de proteínas, via InterProScan e para as análises de Ontologia Gênica (GO).

#### 4.2.4 Montagem do plastoma e anotação

O genoma plastidial de *D. ibiramensis* foi montado utilizando uma abordagem guiada por referência com o genoma plastidial de *Ananas comosus* cultivar MD2 (ID GenBank KR336549) como referência, no software CLC Genomics Workbench. A anotação do genoma plastidial foi realizada usando o GeSeq (TILLICH et al., 2017) na plataforma Chlorobox (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>). Correções foram manualmente efetuadas por meio da verificação cruzada da sequência de consenso do plastoma de *D. ibiramensis*, da sequência de referência e das leituras fastQ. Para o GeSeq, a anotação iniciou a partir de duas anotações de cloroplastos de referência, das espécies *Ananas comosus* e *Puya ferruginea*. Os softwares tRNAscan (CHAN; LOWE, 2019) e Aragorn (LASLETT; CANBACK, 2004) foram utilizados para a busca dos tRNAs, enquanto o mapa circular físico do genoma plastidial foi construído usando o software Organellar Genome DRAW (LOHSE et al., 2013).

#### 4.2.5 Caracterização do genoma plastidial e análises evolutivas

As análises de alinhamento de sequências, avaliações de DOT PLOT e estudos filogenéticos foram realizadas com o auxílio do MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). A busca por Sequências Simples Repetidas (SSRs) foi conduzida por meio do MISA (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>). O DNAsp (ROZAS et al., 2017) foi utilizado para análises de uso de códon (Codon Usage) e variação genética, aplicando o método de Janela Deslizante (*Sliding Window*). O software PREPACT v3 (<https://www.prepact.de/prepact-main.php>) foi usado na análise de sítios de edição de RNA, enquanto a organização estrutural do plastoma, incluindo análises de blocos colineares, foi examinada por meio do MAUVE (DARLING et al., 2004). Para a representação gráfica do genoma plastidial, destacando regiões com SSRs, foi utilizado o CPGAVAS2 (<http://47.96.249.172:16019/analyzer/annotate>).

Para as análises filogenéticas e de DOT PLOT, foram utilizados plastomas de uma ampla gama de espécies referência dentro da família Bromeliaceae e outras, incluindo *Dyckia brevifolia* (ID), *Ananas comosus* (NC\_026220.1), *Puya hutchisonii* (NC\_062152.1), *Puya macropoda* (NC\_062153), *Puya ferruginea* (NC\_062151.1), *Puya raimondii* (NC\_062148.1), *Puya nitida* (NC\_062146.1), *Puya goudotiana* (NC\_062150.1), *Tillandsia purpurea* (MW442083.1), *Hechtia rosea* (NC\_080302.1), *Hechtia mooreana* (NC\_080298.1), *Alcantarea odorata* (NC\_065162.1), *Bakerantha purpusii* (NC\_080288.1), *Barfussia laxissima* (NC\_065163.1), *Catopsis sessiliflora* (NC\_065164.1), *Lameltonia narthcioides* (ON398134.1), *Lutheria splendens* (NC\_065168.1), *Mesoamerantha malvernii* (NC\_080306.1), *Pitcairnia breedlovei* (NC\_080307.1), *Pseudalcantarea macropetala* (NC\_080307.1), *Vriesea sucrei* (NC\_065193.1), *Wallisia cyanea* (NC\_065194.1), *Werauhia vanhyningii* (NC\_065195.1), *Zizkaea tuerckheimii* (ON398163.1). Como grupo externo, foram utilizados *Zea mays* (NC\_001666.2), *Oryza sativa* cultivar Shuhui498 (CP018170.1) e *Arabidopsis thaliana* (NC\_000932.1).

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Características do sequenciamento genômico e montagem de *D. ibiramensis*

Os resultados do sequenciamento e montagem do genoma de *D. ibiramensis* revelaram um total de bases sequenciadas de 1,42 bilhão, proporcionando uma cobertura estimada de 12,7 vezes, tendo por base um genoma haploide de 329,699,231 pb (LIU et al., 2021) A qualidade média por leitura, avaliada pelo *Phred score*, superou o valor de 20, indicando uma alta qualidade das sequências obtidas. A montagem do genoma parcial totalizou 4.647.909 bases

em 660 *contigs*, com um N50 de contigs de 3.998 pares de bases (pb). O N50 de *scaffolds* foi consideravelmente maior, alcançando 20.887 pb, o que sugere uma eficiente integração dos contíguos em estruturas maiores. O maior contíguo identificado possui 326.912 bases, destacando-se pela sua extensão significativa. Por meio da utilização do software Augustus utilizando o milho como uma planta referência, foram preditos 3.734 genes, o que contribui para o entendimento da complexidade genética e biológica da espécie. O conteúdo de GC foi calculado em 45,71%, estando dentro do esperado para espécies vegetais (Tabela 1).

Tabela 1. Dados de sequenciamento e montagem de *Dyckia ibiramensis*.

Characteristic	Value
Total sequenced bases	1.42 billion bases
Estimated coverage	12.7x
Average quality per read (Phred score)	> 20
Number of contigs	32,113
Contig N50	3,998
Scaffold N50	20,887
Largest contig	326912
Gene prediction (Augustus)	3,734
GC content (%)	45.71

#### 4.3.2 Caracterização genômica de *Dyckia ibiramensis*

A análise dos dados genômicos de *D. ibiramensis* demonstrou características distintas que são consistentes com a sua capacidade de sobrevivência e adaptação a um ambiente dinâmico e frequentemente adverso (Figuras 2, 3, 4 e 5). Por meio da análise de Ontologia Gênica (GO), identificou-se uma série de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares que indicam desempenhar um papel fundamental na resposta adaptativa desta espécie (Figuras 2, 3, 4 e 5).

Observa-se na rede de processos biológicos sequências associadas com respostas a estímulos (GO: 0050896), que pode conter genes relacionados a adaptação da espécie ao ambiente (Figura 2). Os nós centrais, que representam a maioria das sequências (i.e GO: 0006807, GO: 0071704, GO: 0044238, GO: 0008152) podem sugerir uma sinalização interativa e uma possível co-regulação entre vias que contribuem para a plasticidade fenotípica observada em *D. ibiramensis*. Além disso, o processo metabólico de compostos contendo nucleobases (GO:0006139) é um componente relevante na rede de processos biológicos, que pode representar a necessidade de manter a integridade genômica e a homeostase celular em detrimento ao estresse que essa espécie enfrenta (Figura 2). As sequências associadas a estes

processos reforçam que a espécie dispõe de um repertório gênico amplo que facilita sua resiliência a perturbações ambientais.

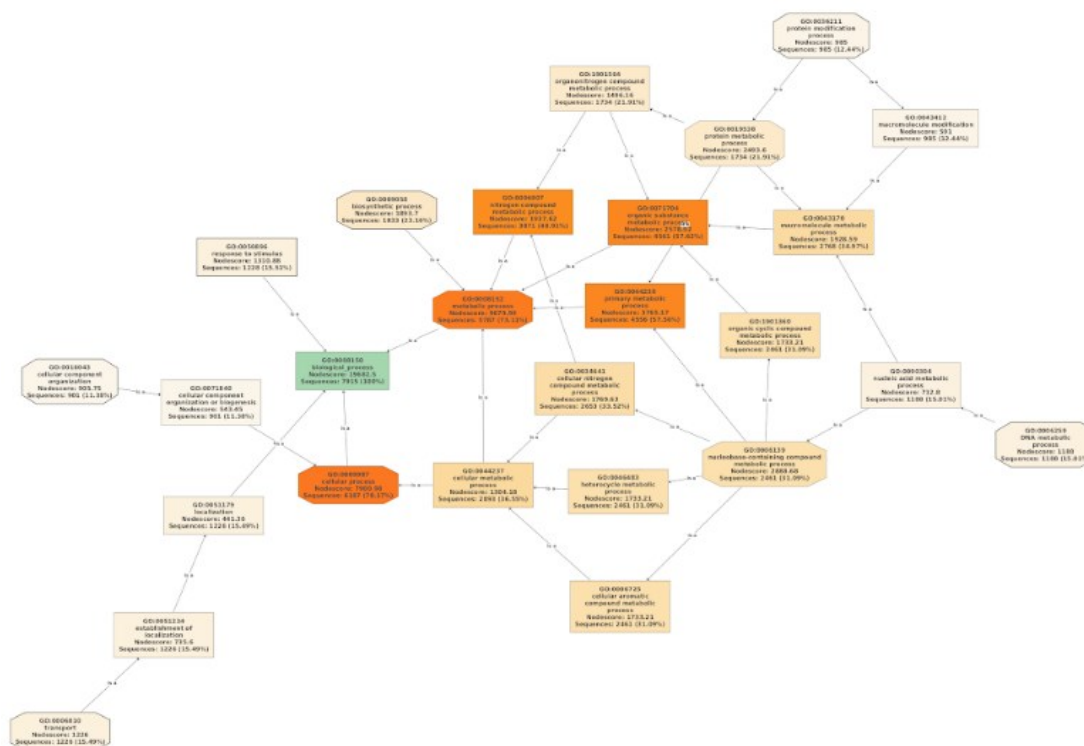


Figura 2. Rede de processos biológicos em *Dyckia ibiramensis*. Box verde: Representa a GO de Processos Biológicos, indicando a categoria principal desta rede. As GO's são representadas em tons de laranja, onde: tons mais claros, indicam GO's com menor número de seqüências, enquanto tons mais escuros, indicam GO's com maior número de seqüências. Clique aqui para visualizar uma versão em alta resolução da Figura.

Na rede de funções moleculares a maioria das seqüências genéticas de *D. ibiramensis* estão envolvidas em ligações (GO:0005488), conforme indicado pelo elevado número de seqüências categorizadas sob o termo, que representa a função de ligação de moléculas diversas (Figura 3). Além disso, um grande conjunto de seqüências está associado à atividade catalítica (GO:0003824), ressaltando a presença elevada de enzimas que desempenham funções centrais em reações metabólicas (Figura 3). Dentro das atividades catalíticas, as funções de hidrolase (GO:0016787) e transferase (GO:0016740) foram proeminentemente representadas, indicando a importância dessas enzimas nas rotas metabólicas da planta (Figura 3). A ligação a ácidos nucleicos (GO:0003676) é outro aspecto destacado pela análise, com um número substancial de seqüências, sugerindo um papel ativo na regulação gênica e na manutenção da integridade do genoma (Figura 3). A afinidade para pequenas moléculas (GO:0036094) e compostos

orgânicos cíclicos (GO:0097159) também é evidenciada pelas sequências categorizadas, o que pode refletir uma adaptação molecular à variação ambiental e estresse (Figura 3).

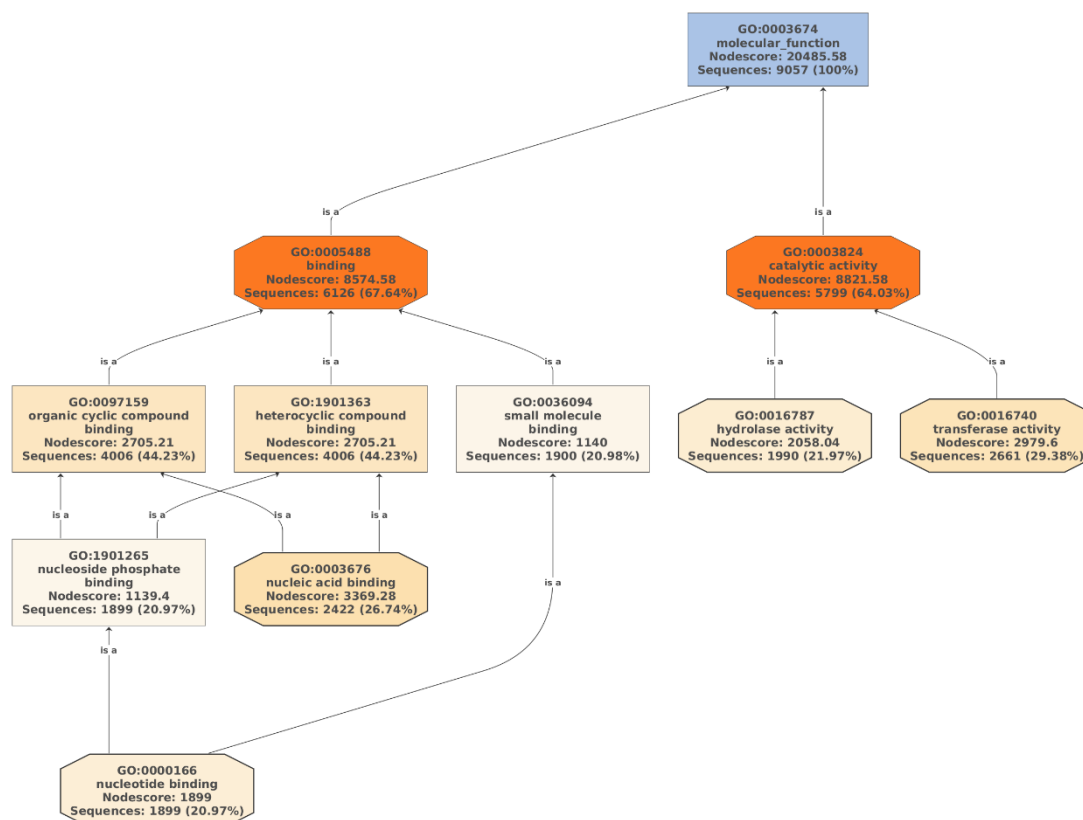


Figura 3. Rede de funções moleculares em *Dyckia ibiramensis*. Box azul: Representa a GO de funções moleculares, indicando a categoria principal desta rede. As GO's são representadas em tons de laranja, onde: tons mais claros, indicam GO's com menor número de sequências, enquanto tons mais escuros, indicam GO's com maior número de sequências.

A análise de componentes celulares por GO identificou uma predominância de sequências associadas a características anatômicas celulares (GO:0110165), cobrindo 94.49% das sequências analisadas, o que enfatiza a complexidade estrutural da célula (Figura 4). Foi constatado nos termos relacionados a organelas (GO:0043226 e GO:0043229), que constituem quase metade das sequências, destacando a relevância de estruturas subcelulares na organização e função celular (Figura 4). Organelas delimitadas por membrana tanto no contexto intracelular quanto em geral (GO:0043227 e GO:0043231) foram verificadas pela análise, refletindo a importância da compartimentalização na fisiologia celular (Figura 4). Além disso, componentes intracelulares como o citoplasma (GO:0005737) e o núcleo (GO:0005634) foram também

relevantes, reforçando seu papel na manutenção de processos celulares vitais (Figura 4). Há presença de sequências associadas a plastídeos (GO:0009536) (Figura 4).

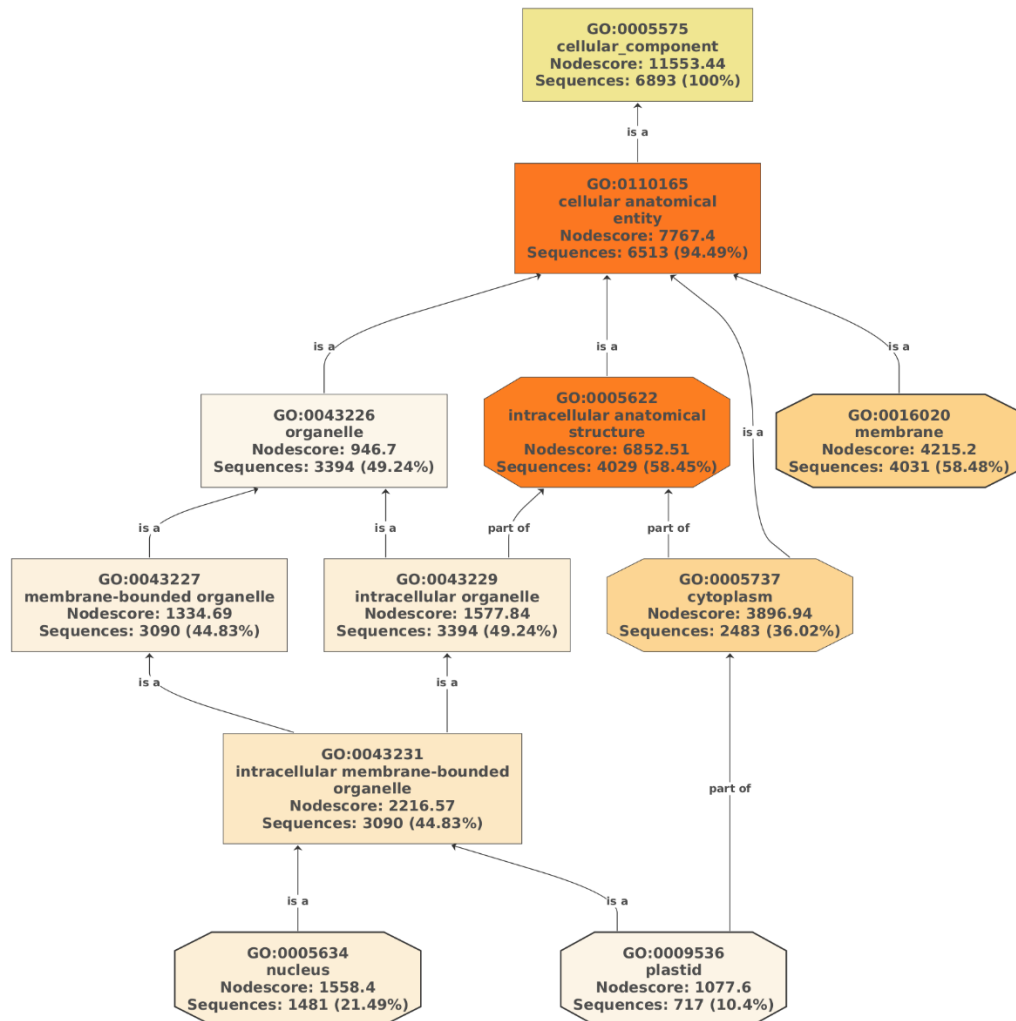


Figura 4. Rede de componentes celulares em *Dyckia ibiramensis*. Box amarelo: Representa a GO de Processos Biológicos, indicando a categoria principal desta rede. As GO's são representadas em tons de laranja, onde: tons mais claros, indicam GO's com menor número de sequências, enquanto tons mais escuros, indicam GO's com maior número de sequências.

A análise integrativa dos dados de GO para *D. ibiramensis* revelou amplo envolvimento em processos biológicos, destacando-se o metabolismo de substâncias orgânicas e processos metabólicos celulares, o que significa uma intensa atividade metabólica essencial à manutenção das funções biológicas da planta (Figura 5a). A funcionalidade molecular é marcada por uma predominância de atividades de ligação e enzimáticas, incluindo a ligação a compostos heterocíclicos e a atividade de hidrolases, que são importantes para a catalização de reações metabólicas e interações moleculares, além de uma presença marcante de fatores de transcrição

ligantes de DNA (Figura 5b). A distribuição de sequências genéticas nos componentes celulares evidencia um papel relevante da membrana, do citoplasma, do nucleoplasma e, de forma notável, do citosol, sugerindo que este último é um centro vital para processos metabólicos variados (Figura 5c).

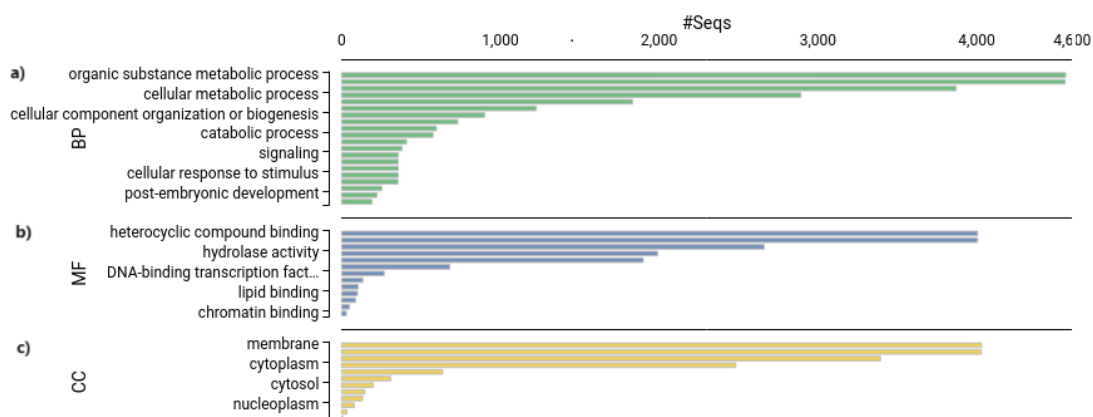


Figura 5. Distribuição de sequências genéticas por categoria de Ontologia Gênica de *Dyckia ibiramensis*. a) Processos biológicos (BP); b) Função molecular (MF); e c) Componentes celulares (CC).

A distribuição das famílias proteicas em *D. ibiramensis* revela uma predominância das sequências ligadas à superfamily DNA/RNA polymerase (IPR043502), seguida pela Ribonuclease H-like superfamily (IPR012337) e pela Tetratricopeptide-like helical domain superfamily (IPR019990), com significativa presença. Destaca-se também a Protein kinase-like domain superfamily (IPR011009) e, em menor grau, a Cytochrome P450 superfamily (IPR036396), essenciais para a resposta ao estresse. Importantes para a regulação da expressão gênica, as sequências da Zinc finger, CCHC-type superfamily (IPR036875), juntamente com a Aspartic peptidase domain superfamily (IPR021109), envolvida em processos proteolíticos e a respostas a estresses abióticos e bióticos, são igualmente notáveis. Superfamílias como Armadillo-like helical (IPR011989) e NAD(P)-binding domain (IPR036291), apresentam-se em menor escala, indicando uma ampla gama de potenciais interações proteicas e adaptações metabólicas (Figura 6A).

A distribuição dos sítios de proteínas detalhada na Figura 6B, destaca o sítio ativo da Serine/threonine-protein kinase (IPR008271) como o mais prevalente, com um total superior a 30 sequências. Esta abundância demonstra a relevância desses sítios nas atividades de sinalização celular mediadas por proteínas quinases. Em paralelo, o domínio de ligação a

nucleotídeos da subunidade alfa/beta da ATPase (IPR020003) é também notável, ambos com cerca de 13 sequências, enfatizando seu papel no metabolismo energético e na fotossíntese. Os sítios conservados do Cytochrome P450 (IPR017972) demonstra uma presença intermediária, implicando seu envolvimento na captura de luz e processos de detoxificação. A presença de sítios como WD40 repeat (IPR017975) e Zinc finger, RING-type (IPR017907), em frequências consideráveis, sugere importância nas interações proteicas e na regulação gênica. Adicionalmente, identificam-se sítios mitocondriais de AMP-binding (IPR020845) e ATPase AAA-type (IPR003960), com um número menor de sequências, mas que ainda assim indicam a participação desses domínios em processos vitais de ligação e hidrólise de ATP na célula de *D. ibiramensis* (Figura 6B).

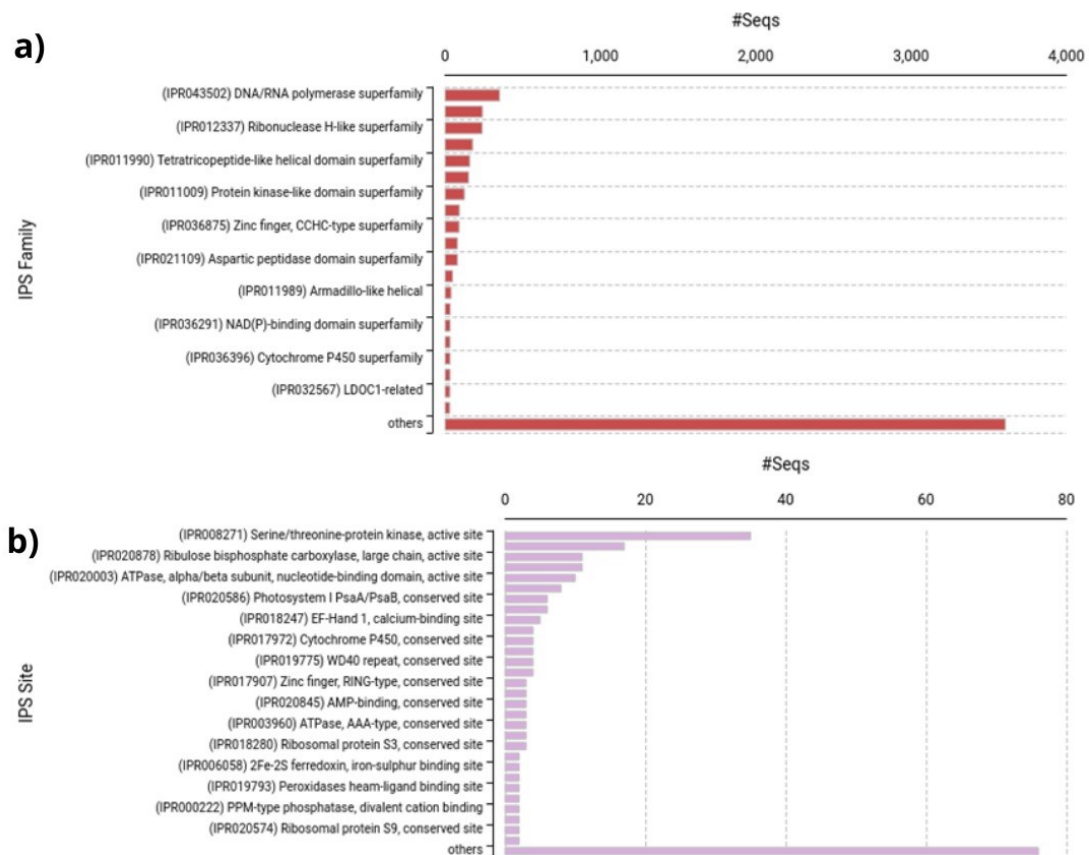


Figura 6. Perfil de distribuição de superfamílias proteicas (A) e sítios ativos (B) em *Dyckia ibiramensis*.

#### 4.3.3 Plastoma

O genoma cloroplastidial de *D. ibiramensis* (ID GenBank OR832762.1) possui o comprimento de 159,176pb e possui a estrutura quadripartite típica, sendo a Região de Cópia



Única (LSC) com o comprimento de 70947pb e a Pequena de Cópia Única (SSC) com 18608pb e duas regiões de Repetição Invertida (IRs) compostas por 26170pb cada. Foram preditos 125 genes no plastoma, incluindo 38 genes codificadores de tRNA (RNA de transferência) e 08 de rRNA (RNA ribossômico) (Figura 7).

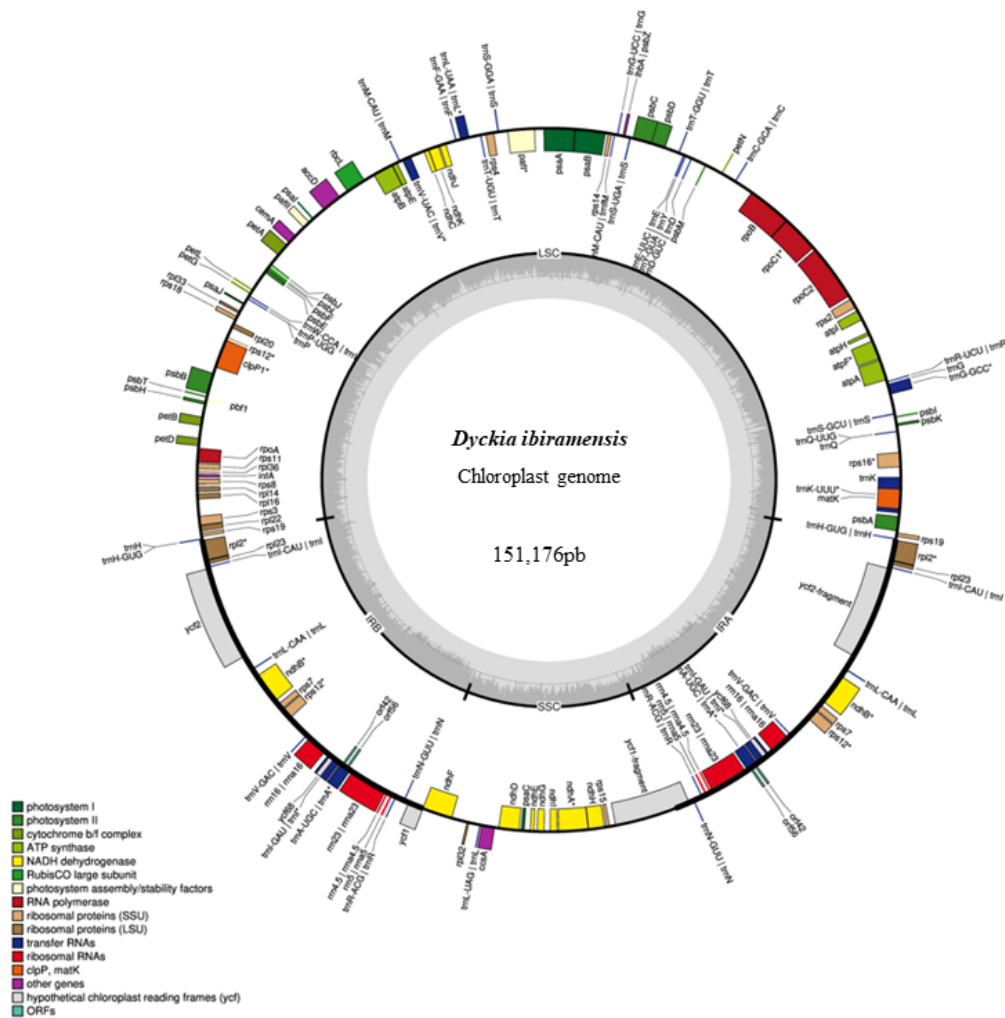


Figura 7. Mapa físico do plastoma de *Dyckia ibiramensis*

Na análise comparativa dos plastomas selecionados, observou-se que *D. ibiramensis* compartilha tamanho e regiões conservadas, com *Ananas comosus* (subfamília Bromelioideae) e *Puya raimondii* (subfamília Pitcairnioideae). Por outro lado, uma notável disparidade é identificada entre os plastomas de *Hechtia rosea* e *Pitcairnia breedlovei* (ambas da subfamília Pitcairnioideae), principalmente em termos de organização genômica (Figura 8). Essas observações sugerem que, enquanto certas características do plastoma são conservadas entre essas espécies, outras refletem adaptações evolutivas distintas, possivelmente em resposta a exigências ecológicas específicas ou distintas linhagens evolutivas.

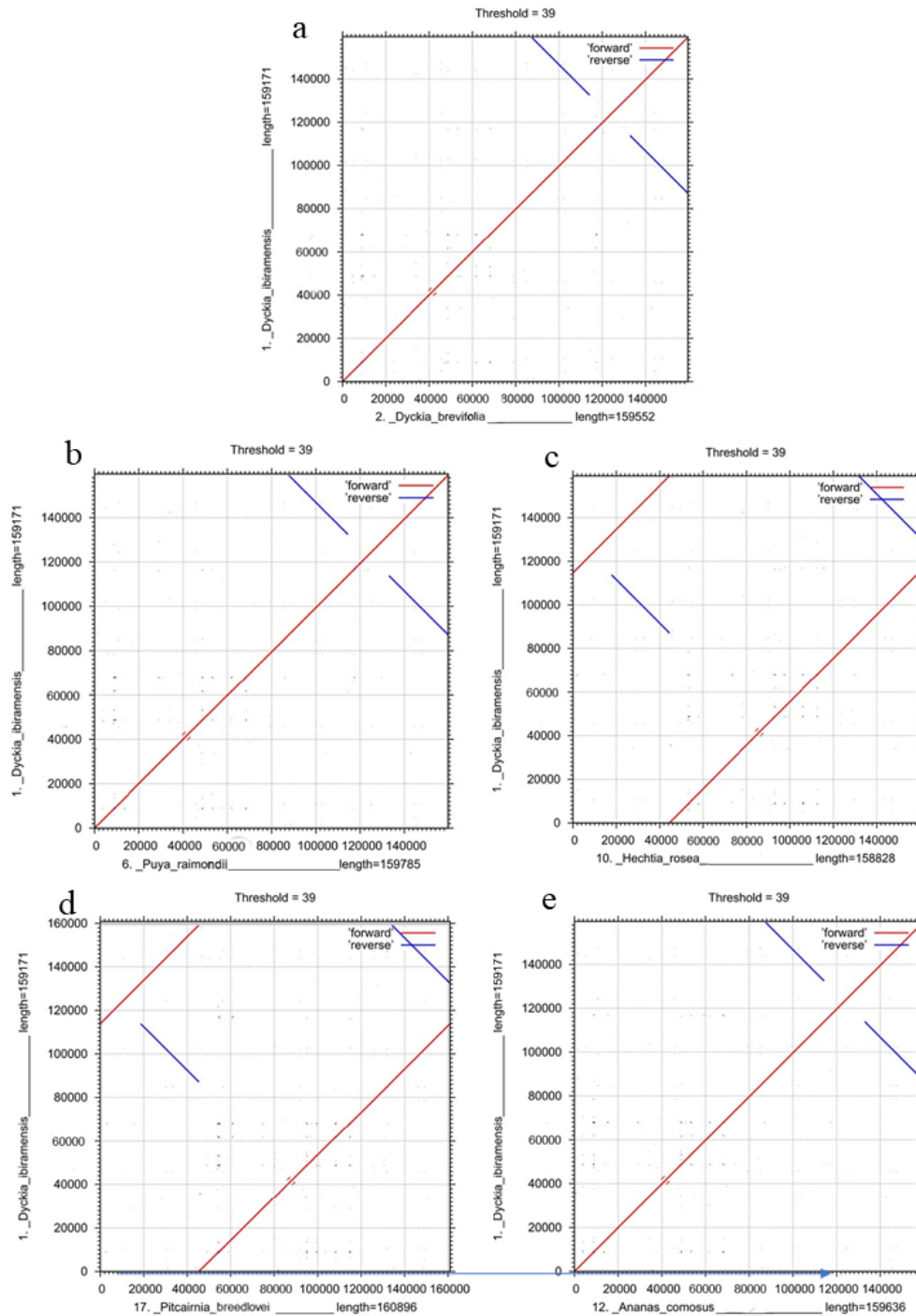


Figura 8. Análise comparativa de sequencias do plastoma de *Dyckia ibiramensis* contra outras sequencias de plastomas de espécies de Bromeliaceae usando Dot Plots do MAFFT. A inclinação vermelha positiva significa que o par de seqüências comparadas é na mesma orientação. A inclinação azul negativa denota que o par de seqüências comparadas podem ser alinhadas, mas sua orientação é oposta. Nos gráficos (c) e (d) destacam-se lacunas e diferenças de posição entre os genomas de *D. ibiramensis*, *Hechtia rosea* e *Pitcairnia breedlovei*.

Uma análise detalhada de blocos colineares foi realizada para complementar as relações evolutivas dentro dos genomas plastidiais de Bromeliaceae (Figura 9). constatou-se que os alinhamentos dos plastomas de espécies selecionadas possuem um conjunto de segmentos de DNA conservados, evidenciados por blocos de cores alinhados verticalmente entre as linhas que representam cada genoma. Estes blocos destacam regiões de homologia, denotando uma colinearidade genética que se estende por diversas espécies dentro da família.

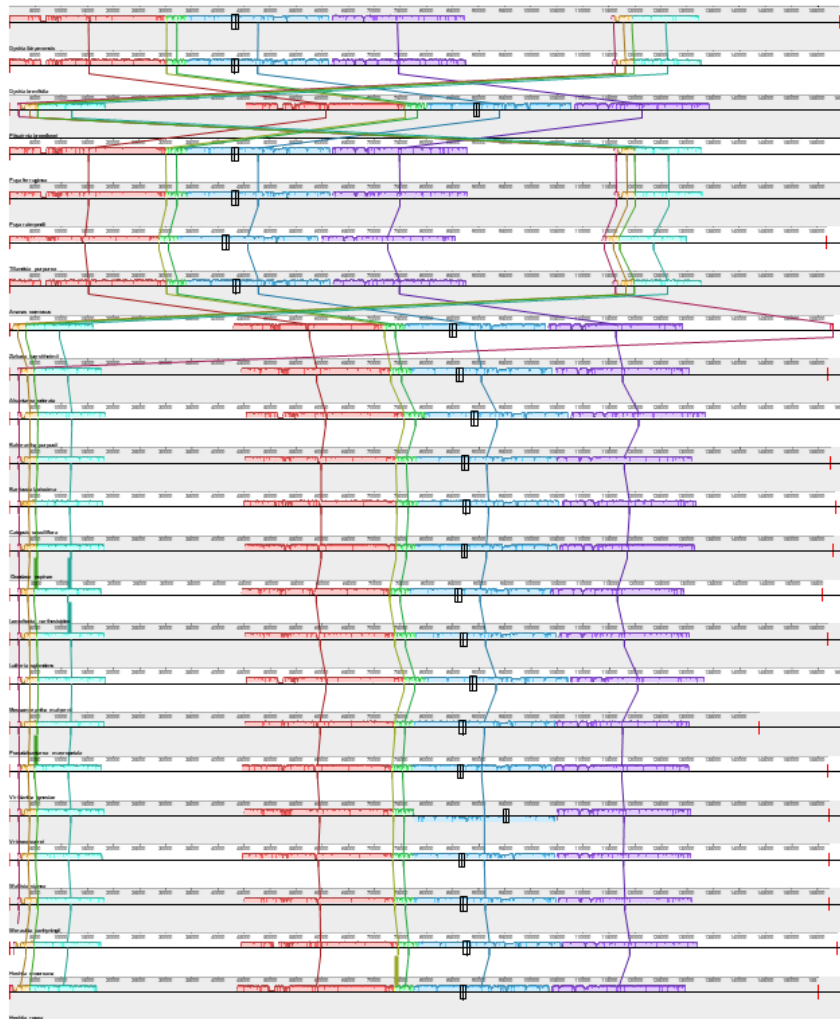


Figura 9. Alinhamento de blocos colineares do software MAUVE de plastomas de espécies da família Bromeliaceae: *D. ibiramensis*; *D. brevifolia*; *P. breedlovei*; *Puya ferruginea*; *P. raimondii*; *Tillandsia purpurea*; *A. comosus*; *Zizkaea tuerckheimii*; *Alcantarea odorata*; *Bakerantha purpusi*; *Barfussia laxissima*; *Catopsis sessiliflora*; *Goudaea ospinae*; *Lameltonia narthecioides*; *Lutheria splendens*; *Mesoamerantha malvernii*; *Pseudoalcanterea macropetala*; *Viridantha ignesia*; *Vriesea sucrei*; *Wallisia cyanea*; *Werauhia vanhyningii*; *H. mooreana* e *H. rosea*. Clique aqui para visualizar uma versão em alta resolução da Figura.

A preservação de blocos colineares na mesma ordem no plastoma demonstra uma conservação evolutiva notável, enquanto as discrepâncias na ordem e presença de blocos indicam rearranjos genômicos, tais como inversões e translocações, marcando episódios de mudanças evolutivas que possivelmente moldaram a configuração dos plastomas. Particularmente, as diferenças nos padrões de colinearidade entre *D. ibiramensis* e espécies como *H. rosea*; *H. mooreana* e *P. breedlovei* sugerem uma evolução divergente dentro da subfamília Pitcairnioideae (Figura 9).

Por meio da análise de filogenia entre as espécies aqui já citadas, é possível observar as similaridades que colocam essas espécies na família Bromeliaceae (Figura 10). Também é possível constatar a formação de um cluster entre *D. ibiramensis*, *D. brevifolia* e *P. breedlovei*, sendo esta última mais distante das duas primeiras espécies. Todas as espécies de *Puya sp.* foram mantidas agrupadas; as espécies de *Hechtia sp.* não foram agrupadas com as *Dyckias* e *Pitcairnia*; *A. comosus* (Bromelioideae) ficou localizada entre as Puyoideae e Hechtioideae, demonstrando ser irmã das Puyoideae.

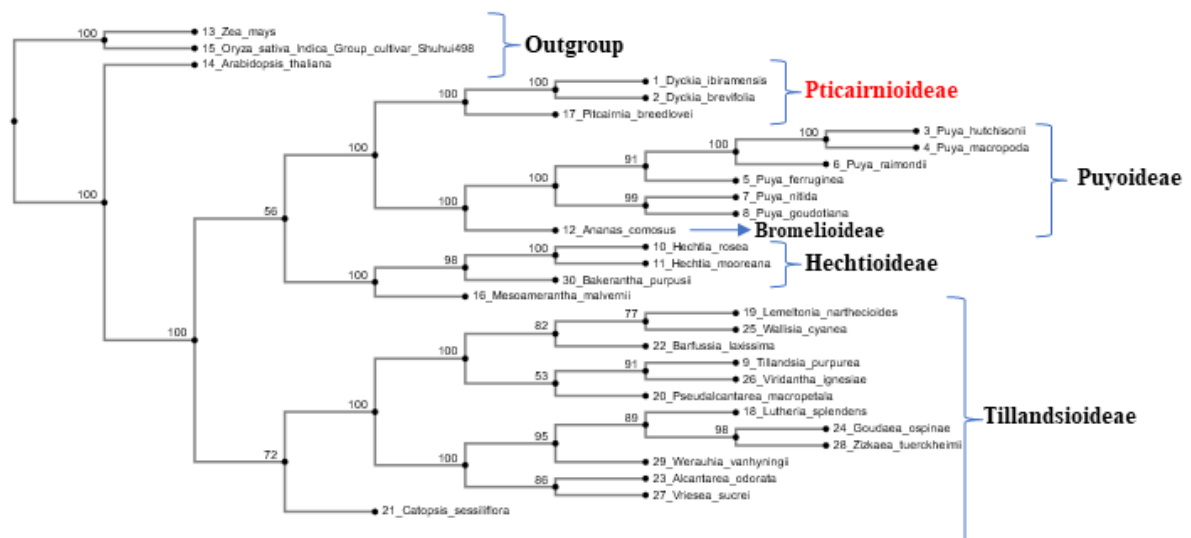


Figura 10. Árvore de relação filogenética entre membros da família Bromeliaceae, revelada por Neighbor-Joining (NJ) através do MAFFT; *Zea Mays*, *Oryza Sativa* e *Arabidopsis thaliana* foram utilizadas como grupo externo.

Para a análise de janela deslizante (Figura 11) foram selecionadas apenas as Bromeliaceae, em base dos resultados do dot plot e alinhamento do MAFFT e foram utilizados os plastomas completos. A diversidade de nucleotídeo ( $\pi$ ) entre todos os plastomas foi de 0,00735; com 3759 sítios de polimorfismos. A região codificante com maior variabilidade foi

do gene *ndhE* ( $\pi > 0,1$ ) seguido do gene *paflII* ( $\pi \geq 0,1$ ); também teve uma diversidade considerável o gene *ccsA* ( $\pi > 0,08$ ).

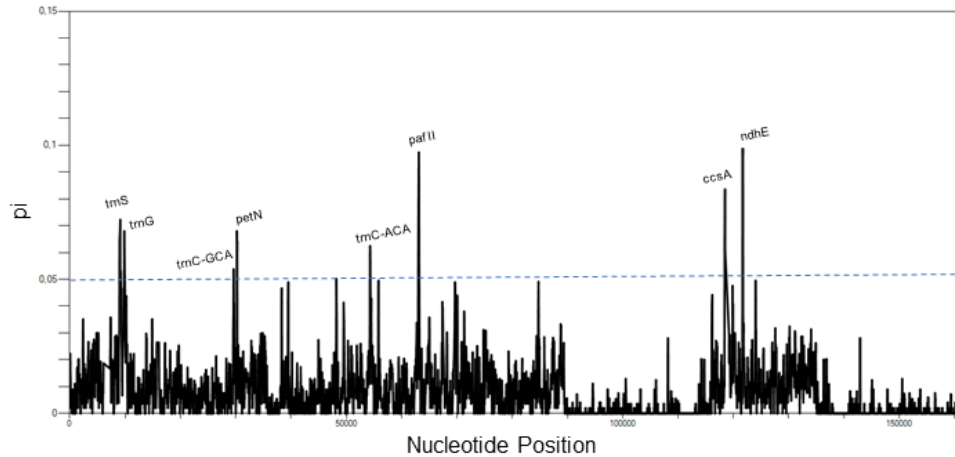


Figura 11. Análise de janela deslizante realizada com o software DNAsp. O eixo X representa a posição nucleotídica ao longo do plasmídeo e o eixo Y denota a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ). A linha tracejada indica o limiar de alto polimorfismo, definido como sete vezes o valor médio de  $\pi$ . A análise foi conduzida com uma janela de 100 pares de bases (pb) e um passo de 25 pb.

Observa-se na Figura 12 a análise de uso relativo de códons sinônimos (RSCU). O Códon AGA que codifica a Arginina teve a maior expressão no plasmídeo (RSCU = 1,95), em contraste, o códon CGC que também codifica Arginina foi o de menor expressão (RSCU = 0,4). Com ausência de viés em uso de códons (i.e RSCU = 1,0), como esperado os códons da Metionina (AUG) e Triptofano (UGG).

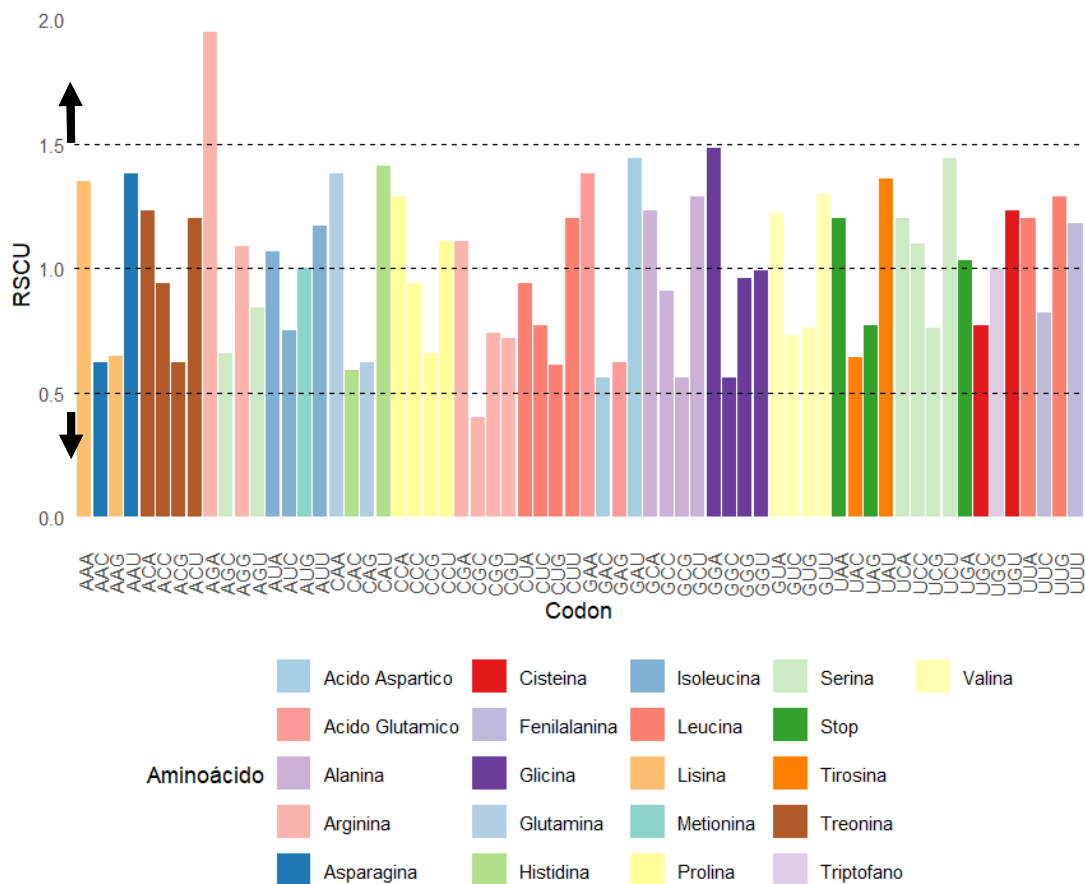


Figura 12. Perfil de uso de códons no plastoma de *Dyckia ibiramensis*. Os valores de RSCU acima de 1,5 (↑) indicam preferência pelo uso do códon correspondente, enquanto valores abaixo de 0,5 (↓) sugerem subutilização. Valores RSCU = 1,0 significa ausência de viés em uso de códon.

Foram realizadas predições de sítios de edição em RNA utilizando o software PREPACT, com base em comparações com as espécies *Cocos nucifera*, *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *O. sativa* e *Z. mays*. Foram identificados 445 sítios de edição, distribuídos em 39 genes. O gene *ndhB* apresentou o maior número de sítios, com um total de 72, enquanto o gene *psbZ* teve o menor número, tendo apenas dois sítios de edição.

Foram identificadas 87 regiões de Sequência Simples Repetidas (ou microsatélites) – SSRs no plastoma, distribuídas em 42 na região LSC, cinco na região SSC e quatro em cada região IR (Figura 13). Foram selecionados 37 SSRs entre monômeros, dímeros e trímeros (Tabela 2) excluindo-se microsatélites compostos desta seleção.

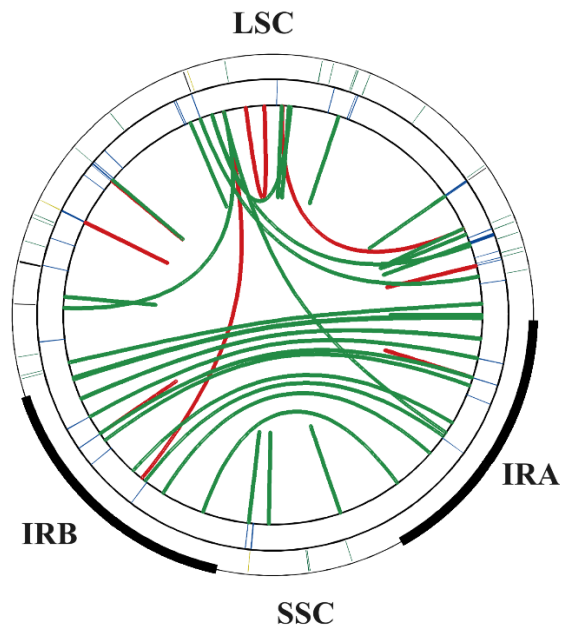


Figura 13. Mapa circular das regiões de Sequência Simples Repetidas (SSRs) ao longo do plastoma de *D. ibiramensis*.

Tabela 2. Caracterização das Sequências Simples Repetidas (SSRs) identificadas no genoma plastidial de *Dyckia ibiramensis*.

ID	SSR nr.	SSR	size	start	End
<i>Dyckia ibiramensis</i>	1	(A)11	11	4477	4487
<i>Dyckia ibiramensis</i>	2	(A)15	15	6302	6316
<i>Dyckia ibiramensis</i>	3	(T)12	12	6736	6747
<i>Dyckia ibiramensis</i>	4	(A)12	12	8247	8258
<i>Dyckia ibiramensis</i>	5	(T)12	12	9360	9371
<i>Dyckia ibiramensis</i>	6	(T)10	10	10078	10087
<i>Dyckia ibiramensis</i>	7	(TA)6	12	15284	15295
<i>Dyckia ibiramensis</i>	8	(TA)6	12	15297	15308
<i>Dyckia ibiramensis</i>	9	(T)12	12	15594	15605
<i>Dyckia ibiramensis</i>	10	(T)12	12	23834	23845
<i>Dyckia ibiramensis</i>	11	(A)14	14	30031	30044
<i>Dyckia ibiramensis</i>	12	(A)11	11	31285	31295
<i>Dyckia ibiramensis</i>	13	(A)10	10	31463	31472
<i>Dyckia ibiramensis</i>	14	(T)11	11	33777	33787
<i>Dyckia ibiramensis</i>	15	(A)10	10	34915	34924
<i>Dyckia ibiramensis</i>	16	(T)10	10	44556	44565
<i>Dyckia ibiramensis</i>	17	(TA)9	18	48306	48323
<i>Dyckia ibiramensis</i>	18	(A)10	10	48723	48732
<i>Dyckia ibiramensis</i>	19	(ATA)6	18	48734	48751
<i>Dyckia ibiramensis</i>	20	(T)10	10	56966	56975
<i>Dyckia ibiramensis</i>	21	(T)10	10	61797	61806
<i>Dyckia ibiramensis</i>	22	(AT)9	18	67954	67971

Continuação da Tabela 2..

ID	SSR nr.	SSR	size	start	End
<i>Dyckia ibiramensis</i>	23	(T)10	10	69470	69479
<i>Dyckia ibiramensis</i>	24	(A)11	11	69828	69838
<i>Dyckia ibiramensis</i>	25	(A)13	13	72232	72244
<i>Dyckia ibiramensis</i>	26	(A)10	10	74282	74291
<i>Dyckia ibiramensis</i>	27	(T)10	10	74322	74331
<i>Dyckia ibiramensis</i>	28	(A)10	10	74407	74416
<i>Dyckia ibiramensis</i>	29	(A)10	10	78488	78497
<i>Dyckia ibiramensis</i>	30	(A)11	11	78514	78524
<i>Dyckia ibiramensis</i>	31	(T)11	11	83734	83744
<i>Dyckia ibiramensis</i>	32	(T)11	11	85579	85589
<i>Dyckia ibiramensis</i>	33	(T)11	11	85893	85903
<i>Dyckia ibiramensis</i>	34	(AT)6	12	116932	116943
<i>Dyckia ibiramensis</i>	35	(T)10	10	122912	122921
<i>Dyckia ibiramensis</i>	36	(A)14	14	123039	123052
<i>Dyckia ibiramensis</i>	37	(A)11	11	127261	127271

#### 4.4 Discussão

O objetivo principal deste estudo foi investigar a complexidade genômica e sua potencial relação com as estratégias adaptativas de *Dyckia ibiramensis*, ameaçada de extinção. Motivados pela urgente necessidade de compreender melhor os mecanismos que permitem a sobrevivência desta espécie às condições variáveis em seu habitat e pela aplicação potencial deste conhecimento na conservação da espécie, realizamos o sequenciamento parcial de seu genoma nuclear, bem como a montagem completa do genoma plastidial. Esta pesquisa visou não apenas contribuir para a biologia da conservação de *D. ibiramensis*, mas também explorar as bases genéticas de sua resiliência a estressores.

Compreender e conservar a biodiversidade vegetal e animal é importante para o bem-estar humano. Isto é particularmente importante em regiões ricas em espécies únicas, como os ecossistemas próximos de rios, que são pontos críticos para a conservação das plantas (DAVIES, 2010). *Dyckia ibiramensis* com sua limitada distribuição às margens do rio Itajaí do Norte é adaptada a condições, tais como: flutuações da água e vazantes, alta luminosidade em períodos de seca, as quais estão sublinhadas com sua importância ecológica e sua vulnerabilidade (HMELJEVSKI et al., 2011b). A espécie mostra um sistema reprodutivo misto, com destaque para sua propagação clonal, permitindo sua manutenção e potencialidade de expandir sua população diante um ambiente estressante (ROGALSKI et al., 2021). No entanto, a conservação da biodiversidade nestas regiões é muitas vezes negligenciada, apesar do seu elevado endemismo vegetal (COX; UNDERWOOD, 2011; JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014).



O sequenciamento e a montagem do genoma de *D. ibiramensis*, destacam sua complexidade e adaptabilidade. A obtenção de 1,42 bilhões de bases sequenciadas com uma cobertura de 12,7x do genoma, a montagem de 32.113 contigs e a identificação de 3.734 genes (Tabela 1), permite comparar a complexidade genômica de *D. ibiramensis* com outras espécies vegetais, incluindo aquelas com genomas extensivamente mapeados (LIU et al., 2021). Apesar de termos montado somente uma pequena porção do genoma nuclear total da espécie, a identificação de 3.734 genes e um conteúdo de GC de 45,71% reforça a riqueza funcional e adaptativa de *D. ibiramensis*, alinhando-se com o esperado para espécies vegetais e demonstrando a importância desta pesquisa para a conservação e compreensão da espécie. Por meio da análise dos resultados genômicos de *D. ibiramensis*, ressaltamos a alta qualidade das sequências, evidenciada por um *Phred score* superior a 20. A montagem do genoma, com um N50 de contigs de 3.998 pb e um N50 de scaffolds de 20.887 pb, demonstra uma alta qualidade e integridade, importantes para um mapeamento genético preciso. O destaque para o maior *contig*, com 326.912 bases, enfatiza a capacidade de reconstruir regiões genômicas extensas, importantes para compreender a complexidade biológica da espécie.

A análise de Ontologia Gênica revelou a presença de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares críticos para a sobrevivência e adaptação de *D. ibiramensis* (Figuras 2, 3, 4). Este estudo corrobora pesquisas anteriores, enfatizando a essencialidade dos mecanismos regulatórios e da tolerância cruzada em permitir que plantas se adaptem a ambientes adversos (MITTLER, 2006; ZIESCHANK; MUOLA; JUNKER, 2023). Os mecanismos identificados no presente trabalho envolvem redes complexas de sinalização e regulação gênica que otimizam a resposta da planta e promovem a resiliência em detrimento de desafios ambientais. As complexas redes de sinalização e regulação genética nas plantas que estão relacionadas a alterações climáticas e stress abiótico, geralmente estão atreladas a aspectos genéticos e bioquímicos associados a sensores de estresse, memória de estresse e tolerância adquirida ao estresse (BIGOT et al., 2018).

A adaptabilidade de *D. ibiramensis* ao seu habitat é destacada pela identificação de sequências associadas à resposta a estímulos ambientais (GO: 0050896), que promovem plasticidade fenotípica (YEAMAN et al., 2014). A rede de processos biológicos, evidenciada na Figura 2, mostra nós centrais como GO: 0006807, GO: 0071704, GO: 0044238, e GO: 0008152, indicando um mecanismo de sinalização interativa e potencial co-regulação entre diferentes vias. Esse arranjo promove a capacidade necessária para a sobrevivência em ambientes com alto estresse. A ligação desses nós com processos metabólicos (GO:0008152) sugere ajustes que podem conferir vantagens adaptativas à *D. ibiramensis* em seu ambiente,

enquanto a participação no metabolismo de compostos contendo nucleobases (GO:0006139) ressalta a importância da manutenção da integridade genômica e da homeostase celular em situações de estresse.

Analisando as funções moleculares, a maioria das sequências genéticas demonstra envolvimento em atividades de ligação (GO:0005488) e catalíticas (GO:0003824), especialmente nas funções de hidrolases (GO:0016787) e transferases (GO:0016740). Esses achados, detalhados na Figura 3, evidenciam um papel ativo dessas enzimas nas vias metabólicas, fundamentais para a adaptação da planta às variações ambientais e estresses (HAYES; PULFORD, 1995; RAUWERDINK; KAZLAUSKAS, 2015).

A estrutura celular de *D. ibiramensis*, conforme apresentado na análise de componentes celulares (Figura 4), destaca a predominância de sequências relacionadas a organelas (GO:0043226 e GO:0043229) e a componentes intracelulares essenciais como o citoplasma (GO:0005737) e o núcleo (GO:0005634). A presença de sequências associadas a plastídeos (GO:0009536) reforça a importância dessas organelas para a adaptabilidade e sobrevivência da espécie. Este entendimento é relevante ao considerarmos que organelas como mitocôndrias e plastídeos são primordiais para as funções celulares, com os plastídeos desempenhando um papel importante na adaptabilidade e sobrevivência das espécies devido ao seu envolvimento em processos metabólicos. Além disso, a integração dos processos do citoplasma e dos cloroplastos é importante para o funcionamento eficiente do metabolismo celular. Esta integração envolve uma troca de metabolitos e informações entre o citoplasma e os plastídeos (ROLLAND et al., 2012). É bem provável que as adaptações evolutivas otimizaram essas interações para a sobrevivência da espécie, demonstrando a complexidade dos sistemas de regulação e sinalização que permitem a *D. ibiramensis* sobreviver até então em um habitat com mudanças climáticas e hídricas constantes.

A análise integrativa dos dados de GO reforça a compreensão dos mecanismos subjacentes da *D. ibiramensis* (Figura 5). O destaque para o metabolismo de substâncias orgânicas e processos metabólicos celulares (Figura 5a), que demonstra uma intensa atividade metabólica que é essencial para a manutenção das funções biológicas vitais da planta. Essa intensidade metabólica evidencia a dinâmica bioquímica interna de *D. ibiramensis*, preparando-a para enfrentar e se adaptar a variados desafios ambientais. No nível molecular (Figura 5b), a predominância de atividades de ligação e enzimáticas esclarece as funções da ligação a compostos heterocíclicos e da atividade das hidrolases. Estas enzimas catalisam reações metabólicas e medeiam interações moleculares, sustentando as vias bioquímicas que sustentam a planta. Além disso, a presença de fatores de transcrição de ligação ao DNA sugere uma

complexa rede reguladora genética para facilitar a adaptação de *D. ibiramensis* ao seu ambiente. Esses fatores de transcrição, são fundamentais na interpretação de sinais ambientais e na modulação do metabolismo celular e da expressão gênica, preparando para as adaptações responsivas da planta (REHMAN; MAHMOOD, 2015; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

A distribuição de sequências genéticas nos componentes celulares evidencia um papel relevante da membrana, do citoplasma, do nucleoplasma e, de forma notável, do citosol, sugerindo que este último é um centro vital para processos metabólicos variados (Figura 5c). O citosol é relevante para vários processos metabólicos, reforçando a noção de que a interação e a transferência eficiente de informações e metabólitos entre compartimentos celulares são indispensáveis para a adaptabilidade e sobrevivência, ajustando-se a planta a mudanças ambientais e sinais internos (IGAMBERDIEV; BYKOVA, 2018).

No presente trabalho destaca-se quanto às famílias proteicas a predominância das sequências ligadas à superfamília DNA/RNA polimerase (IPR043502). Essas são essenciais para a replicação, reparo do DNA e transcrição do RNA (SAUGUET, 2019), processos fundamentais para a conservação da integridade genética e adaptação às mudanças ambientais. Igualmente, as superfamílias Ribonuclease H-like (IPR012337) e Tetratricopeptide-like helical domain (IPR019990) enfatizam as características dos sistemas celulares de sinalização e regulação, destacando a importância do processamento do RNA e do reconhecimento de proteínas específicas em *D. ibiramensis*. As sequências da Protein kinase-like domain superfamily (IPR011009) e da Cytochrome P450 (IPR036396) ressaltam funções na resposta ao estresse, com as quinases de proteína essenciais na transdução de sinal e as enzimas Cytochrome P450 envolvidas na biossíntese de compostos fitoquímicos e na detoxificação. Além disso, as superfamílias Zinc finger, tipo CCHC (IPR036875), e domínio peptidase aspártica (IPR021109) destacam-se pela regulação da expressão gênica e processos proteolíticos, provavelmente relacionados à capacidade da planta de se ajustar rapidamente a diversas condições ambientais (BOGAMUWA; JANG, 2014).

Complementando a discussão sobre as famílias proteicas em *D. ibiramensis*, os resultados da análise dos sítios ativos e domínios proteicos demonstram ainda mais as características bioquímicas que sustentam a eficiência energética e adaptabilidade da espécie. O sítio ativo da Serina/treonina-proteína quinase (IPR008271), que se destaca pela sua prevalência, juntamente com o papel fundamental do sítio ativo da unidade maior da Rubisco (IPR020878) e do domínio de ligação a nucleotídeos da ATPase (IPR020003), no metabolismo energético e na fotossíntese, ressalta a capacidade excepcional da planta de otimizar a produção

e uso de energia. Além disso, os sítios conservados do Fotossistema I e do Cytochrome P450, em combinação com domínios como a repetição WD40 e o Zinc finger, tipo RING, revelam uma intrincada rede de processos bioquímicos. Estes processos estão envolvidos na captação de luz, detoxificação, interações proteicas e regulação gênica, evidenciando uma grandeza molecular que prepara a planta para enfrentar estresses ambientais variados (CIFTICI-YILMAZ; MITTLER, 2008; MACKEH et al., 2018). Como em seu ciclo anual *D. ibiramensis* intercala períodos de alta incidência de luz solar e períodos submersos, em que ocorre difração da luz que chega às suas folhas, essas interações são essenciais para sua sobrevivência.

A montagem e análise do plastoma de *D. ibiramensis* oferecem visões abrangentes sobre a dinâmica estrutural e funcional dos genomas dos cloroplastos nesta espécie endêmica (Figura 7). A montagem do plastoma revelou a extensão de 159.171 pares de bases, que demonstra sua conservação estrutural. Esse aspecto reforça também a ideia de que estas organelas são fundamentais para a manutenção de funções críticas (SONG et al., 2021; YANG; LI; ZHAO, 2019).

A presença de genes essenciais para o fotosistema II (psbA, psbB, psbC, psbD) na região LSC, juntamente com genes para o fotosistema I (psaA, psaB), o complexo desidrogenase NAD(P)H (ndhA, ndhB, ndhC, ndhD), o complexo citocromo b6f (petA, petB) e ATP sintase (atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI) em todo o plastoma, ressalta a função central dos cloroplastos na captura e conversão de energia luminosa em energia química. Esta capacidade é fundamental para a fotossíntese, permitindo que *D. ibiramensis*, uma espécie que habita em rochas e ambientes reofíticos, maximize a eficiência fotossintética em seu habitat extremo, onde a exposição à luz e as condições de estresse podem variar significativamente (XU; WANG, 2019; ZHANG et al., 2020). Além disso, a anotação de múltiplos genes de tRNA reforça a autonomia funcional dos cloroplastos, possibilitando a síntese *in situ* de proteínas essenciais. Este aspecto é particularmente relevante para a adaptação e sobrevivência de *D. ibiramensis*, pois facilita respostas rápidas às mudanças ambientais, ajustando a maquinaria fotossintética e outras vias metabólicas essenciais. O gene rubisco (rbcL), por exemplo, desempenha um papel crítico na fixação de carbono, um processo chave na eficiência fotossintética e, conseqüentemente, na adaptabilidade da planta a diferentes níveis de CO<sub>2</sub> e intensidades de luz (BAYLY et al., 2013; DOBROGOJSKI; ADAMIEC; LUCIŃSKI, 2020).

A similaridade no tamanho dos plastomas e a manutenção de regiões genômicas entre *D. ibiramensis*, *Ananas comosus* e *Puya raimondii* (Figura 8) indicam a possibilidade de eventos evolutivos compartilhados ou pressões seletivas comuns a estas subfamílias. Por outro lado, as diferenças observadas nos plastomas de *Hechtia rosea* e *Pticairnia breedlovei*,

especialmente em relação à organização genômica, podem ser indicativos de adaptações específicas ao nicho ecológico ou de divergências evolutivas que ocorreram após a especiação destas linhagens (Figuras 8 e 9). A árvore filogenética (Figura 10) resultou em um alinhamento com as mais recentes classificações das subfamílias de Bromeliaceae, em especial a Pitcairnioideae (GIVNISH et al., 2007, 2011). Os resultados reforçam a monofilia das espécies de *Dyckia* e sugerem uma relação de grupo irmão entre as subfamílias Bromelioideae e Puyoideae, todos suportados por altos valores de *Bootstrap*, corroborando os estudos anteriores (SCHÜTZ et al., 2016).

Em comparação com plastomas das espécies de Bromeliaceae, na análise de janela deslizante foi observado que a *D. ibiramensis* possui os genes *ndhE* e *pafII* com maior valor pi, sendo o primeiro com maior destaque. Alto valor pi em análises de janela deslizante demonstra grande variabilidade dentro dessa região, podendo indicar pressão seletiva, alta taxa de mutação ou recombinação genética (SHEIKH-ASSADI et al., 2022). O fato desses picos serem observados demonstra que essas regiões são *hotspots* para variação genética, sugerindo que estão envolvidas na evolução adaptativa da espécie.

Entretanto, informações que permitam a compreensão das relações entre as espécies do gênero *Dyckia* Schult. & Schult.f, bem como os mecanismos de especiação são limitadas e desafiadoras. Essa escassez de informações pode ser atribuídas a natureza endêmica e à raridade de muitas dessas espécies, ao fato de serem conhecidas apenas por sua localidade-tipo, e um outro problema é a alta plasticidade morfológica intraespecífica (KRAPP et al., 2012). Características morfológicas no gênero *Dyckia* evoluíram várias vezes na história, o que contribui para a hipótese desse gênero ser de origem recente (KRAPP et al., 2014; PINANGÉ et al., 2017a). Além disso, as espécies de *Dyckia* podem não ser apenas morfológicamente distintas, mas também geneticamente distintas (KRAPP et al., 2014).

No presente estudo, observamos uma prevalência do códon AGA, que codifica arginina, o que pode indicar adaptações específicas no mecanismo de tradução de *D. ibiramensis*. Este uso preferencial pode refletir uma eficiência traducional otimizada, onde a disponibilidade de tRNAs correspondentes ou a velocidade de reconhecimento pelo ribossomo são maximizadas, facilitando uma rápida síntese proteica em resposta a condições ambientais específicas. Tal padrão é suportado por estudos que associam variações no uso de códons com respostas adaptativas a estresses ambientais (TYAGI et al., 2023). Este achado destaca a complexidade da regulação gênica em *D. ibiramensis* e sugere que alterações no uso de códons podem oferecer vantagens adaptativas, influenciando a eficiência da expressão gênica e, potencialmente, a funcionalidade das proteínas.

Destacamos ainda, a presença de sítios de edição de RNA no gene *ndhB* do plastoma, evidenciando uma complexa regulação pós-transcricional essencial para a funcionalidade do complexo NADH desidrogenase. Essas modificações pós-transcricionais nos nucleotídeos do mRNA são relevantes para garantir a expressão correta das proteínas de *ndhB*, adaptando a atividade fotossintética da planta às extremas variações ambientais típicas de seu habitat rochoso e exposto. Este achado corrobora evidências de estudos em outras espécies, como *A. thaliana*, onde a edição de RNA no *ndhB* desempenha um papel vital na manutenção da eficiência fotossintética sob condições de estresse (FU et al., 2022). Portanto, os sítios de edição de RNA observados não apenas reforçam a importância desta regulação para a adaptação ambiental de *Dyckia ibiramensis*, mas também sugerem uma complexidade adicional na regulação gênica crucial para a otimização da função cloroplastídica e sobrevivência em ambientes desafiadores.

A identificação de regiões SSR no plastoma de *D. ibiramensis* destaca sua utilidade como marcadores moleculares para futuros estudos sobre a variabilidade genética dentro do gênero *Dyckia*, a conservação de *D. ibiramensis* e a diversidade genética da família Bromeliaceae. A análise do plastoma complementa a compreensão da complexidade genômica e adaptativa de *D. ibiramensis*, ilustrando como a estrutura e função dos cloroplastos contribuem para a resiliência desta espécie a condições ambientais adversas. Além disso, a integração de dados genômicos nucleares e de cloroplastos abre novas vias para estudos futuros sobre a evolução, adaptação e conservação desta e de outras espécies de plantas endêmicas em habitats similares. Adicionalmente, apesar da grande utilidade de estudos filogenômicos e evolutivos baseados em sequências completas de cloroplastos, o plastoma apresentado neste trabalho é o primeiro depositado no Genbank (ID OR832762) para espécies do gênero *Dyckia*.

#### 4.5 Conclusões

Este estudo demonstrou aspectos fundamentais sobre a complexidade genética e as capacidades adaptativas de *Dyckia ibiramensis*, uma espécie endêmica e ameaçada do sul do Brasil. O sequenciamento parcial de seu genoma e a montagem do seu plastoma permitiram identificar genes importantes para a fotossíntese, metabolismo e adaptação ao estresse ambiental, ressaltando a complexidade genética e funcional de *D. ibiramensis*.

Os resultados revelaram uma cobertura genômica de 12,7x e a identificação de 3.734 genes, evidenciando a diversidade funcional e a notável capacidade de resiliência da espécie. A montagem do plastoma mostrou-se essencial para a eficiência fotossintética e adaptabilidade, contendo genes importantes para os fotossistemas e a fixação de carbono. Este estudo não

apenas amplia nosso conhecimento sobre a biologia de *D. ibiramensis*, mas também sublinha a importância da genômica na conservação de espécies ameaçadas.

Este trabalho abre novas possibilidades para a utilização biotecnológica das características adaptativas de *D. ibiramensis*, com potenciais aplicações na conservação e no manejo de ambientes extremos. Além disso, os dados fornecidos enriquecem o banco de dados genômicos globais, oferecendo recursos valiosos para futuras pesquisas em genética de conservação, evolução de plantas e biologia de sistemas.

Recomenda-se que pesquisas futuras incluam o sequenciamento de mais indivíduos e outras espécies dentro do gênero *Dyckia*, para explorar a variabilidade genética e compreender melhor as forças evolutivas que influenciam a especiação e os mecanismos de diferenciação morfológicas e genéticas intraespecíficas. Investigações mais detalhadas sobre a expressão gênica e funcionalidade proteica em *D. ibiramensis* poderiam elucidar como as adaptações são reguladas em nível molecular em resposta a estresses ambientais específicos.

Este estudo contribui para a ciência da conservação, estabelecendo bases para a proteção de uma espécie e destacando a relevância da pesquisa genômica para a compreensão e preservação da biodiversidade global.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, S. et al. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **The Nucleus**, v. 60, n. 3, p. 283–297, 1 dez. 2017.
- ANTAR, G. M. et al. Novelties in *Dyckia* (Pitcairnioideae - Bromeliaceae) from the South America dry diagonal: Two new species, a new combination and a new name. **Feddes Repertorium**, v. 132, n. 3, p. 269–278, 2021.
- ANTONELLI, A. The rise and fall of Neotropical biodiversity. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 199, n. 1, p. 8–24, 1 maio 2022.
- BAYLY, M. J. et al. Chloroplast genome analysis of Australian eucalypts – *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Angophora*, *Allosyncarpia* and *Stockwellia* (Myrtaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 704–716, 1 dez. 2013.
- BIGOT, S. et al. Pivotal roles of environmental sensing and signaling mechanisms in plant responses to climate change. **Global Change Biology**, v. 24, n. 12, p. 5573–5589, 2018.
- BOGAMUWA, S. P.; JANG, J.-C. Tandem CCCH zinc finger proteins in plant growth, development and stress response. **Plant & Cell Physiology**, v. 55, n. 8, p. 1367–1375, ago. 2014.
- BOOY, G. et al. Genetic Diversity and the Survival of Populations. **Plant Biology**, v. 2, n. 4, p. 379–395, 2000.

- CHAN, P. P.; LOWE, T. M. tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1962, p. 1–14, 2019.
- CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. The zinc finger network of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7, p. 1150–1160, 1 abr. 2008.
- COX, R. L.; UNDERWOOD, E. C. The Importance of Conserving Biodiversity Outside of Protected Areas in Mediterranean Ecosystems. **PLOS ONE**, v. 6, n. 1, p. e14508, 7 jan. 2011.
- DAR, A.; MAHAJAN, R.; SHARMA, S. Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 89, p. 1755–1763, 1 nov. 2019.
- DARLING, A. C. E. et al. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394–1403, jul. 2004.
- DAVIES, P. M. Climate Change Implications for River Restoration in Global Biodiversity Hotspots. **Restoration Ecology**, v. 18, n. 3, p. 261–268, 2010.
- DOBROGOJSKI, J.; ADAMIEC, M.; LUCIŃSKI, R. The chloroplast genome: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 6, p. 98, 18 maio 2020.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. (EDS.). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **PHYTOCHEMICAL BULLETIN**, [s.d.].
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FANG, J. et al. Genome-Wide Comparative Analysis of Microsatellites in Pineapple. **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 117–135, 1 set. 2016.
- FISCHER, M. C. et al. Estimating genomic diversity and population differentiation – an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 69, 11 jan. 2017.
- FLANAGAN, S. P. et al. Guidelines for planning genomic assessment and monitoring of locally adaptive variation to inform species conservation. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 7, p. 1035–1052, 2018.
- FLOOD, P. J.; HANCOCK, A. M. The genomic basis of adaptation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 36, p. 88–94, abr. 2017.
- FU, M. et al. OTP970 Is Required for RNA Editing of Chloroplast *ndhB* Transcripts in *Arabidopsis thaliana*. **Genes**, v. 13, n. 1, p. 139, jan. 2022.
- GAO, L.-Z. et al. Evolution of *Oryza* chloroplast genomes promoted adaptation to diverse ecological habitats. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 278, 26 jul. 2019.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. The Genomics of Plant Satellite DNA. Em: UGARKOVIĆ, Đ. (Ed.). **Satellite DNAs in Physiology and Evolution**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 103–143.



GARZA, J. C.; WILLIAMSON, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 305–318, fev. 2001.

GIVNISH, T. et al. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical Biogeography of Bromeliaceae Inferred from *ndhF* Sequence Data. **Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany**, v. 23, n. 1, p. 3–26, 1 dez. 2007.

GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872–895, 2011.

GODOY, F. M. DE R. et al. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 187, n. 4, p. 672–688, 27 jul. 2018.

GOMES, A. C. et al. Adaptive response of extreme epiphyte *Tillandsia* species (Bromeliaceae) is demonstrated by different sexual reproduction strategies in the Brazilian Chaco. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 4, p. 840–854, 27 mar. 2020.

GOMES-DA-SILVA, J.; SANTOS-SILVA, F.; FORZZA, R. C. Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 5, p. 467–490, 4 jul. 2019a.

GOMES-DA-SILVA, J.; SANTOS-SILVA, F.; FORZZA, R. C. Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 5, p. 467–490, 4 jul. 2019b.

GONZÁLEZ-ASTORGA, J. et al. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 94, n. 4, p. 545–551, out. 2004.

GOSSMANN, T. I. et al. Genome Wide Analyses Reveal Little Evidence for Adaptive Evolution in Many Plant Species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 8, p. 1822–1832, 1 ago. 2010.

GÖTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 1 jun. 2008.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290–302, 3 mar. 2016.

HARRISSON, K. A. et al. Using genomics to characterize evolutionary potential for conservation of wild populations. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 9, p. 1008–1025, 2014.

HASSAN, A. H.; MOKHTAR, M. M.; EL ALLALI, A. Transposable elements: multifunctional players in the plant genome. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 4 jan. 2024.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6, p. 445–600, 1995.

HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761–769, 1 jun. 2011a.

HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761–769, 1 jun. 2011b.

HORNUNG-LEONI, C. T. et al. Genetic variation in the emblematic *Puya raimondii* (Bromeliaceae) from Huascarán National Park, Peru. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 67–74, mar. 2013.

HUNTER, J. The Matplotlib User's Guide. [s.d.].

IGAMBERDIEV, A. U.; BYKOVA, N. V. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants. **Free Radical Biology and Medicine**, Redox Signalling in Plants and Implications for Mammalian Physiology. v. 122, p. 74–85, 1 jul. 2018.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459–473, 2014.

KRAPP, F. et al. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 12, p. e470–e473, 2012.

KRAPP, F. et al. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 7, p. 1591–1614, 1 ago. 2014.

KRAPP, F.; EGGLI, U. *Dyckia* BROMELIACEAE. Em: EGGLI, U.; NYFFELER, R. (Eds.). **Monocotyledons**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020a. p. 893–962.

KRAPP, F.; EGGLI, U. *Dyckia* BROMELIACEAE. Em: EGGLI, U.; NYFFELER, R. (Eds.). **Monocotyledons**. Illustrated Handbook of Succulent Plants. Berlin, Heidelberg: Springer, 2020b. p. 893–962.

KRASILEVA, K. V. The role of transposable elements and DNA damage repair mechanisms in gene duplications and gene fusions in plant genomes. **Current Opinion in Plant Biology**, Genome studies and molecular genetics. v. 48, p. 18–25, 1 abr. 2019.

LASLETT, D.; CANBACK, B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 11–16, 2004.

LEMOS, R. P. M. et al. Characterization of Plastidial and Nuclear SSR Markers for Understanding Invasion Histories and Genetic Diversity of *Schinus molle* L. **Biology**, v. 7, n. 3, p. 43, set. 2018.

LI, S. et al. The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 654–670, 2017.

- LIN, J.; MING, R. Sequencing and Assembly of the Pineapple Genome. Em: MING, R. (Ed.). **Genetics and Genomics of Pineapple**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 97–107.
- LIN, L.; SHARMA, A.; YU, Q. Recent amplification of microsatellite-associated miniature inverted-repeat transposable elements in the pineapple genome. **BMC Plant Biology**, v. 21, p. 424, 18 set. 2021.
- LIU, J.; GUYOT, R.; MING, R. Transposable Elements in the Pineapple Genome. Em: MING, R. (Ed.). **Genetics and Genomics of Pineapple**. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 22p. 155–165.
- LIU, L. et al. Draft genome of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the Queen of the Andes. **Genomics**, v. 113, n. 4, p. 2537–2546, 1 jul. 2021.
- LOHSE, M. et al. OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W575-581, jul. 2013.
- MAAGD, R. A. DE; WIEL, C. C. M. VAN DE; SCHOUTEN, H. J. **The plasticity of plant genomes : Causes and consequences: a survey of data on structural genome variation in plants**. Bilthoven: Cogem, 2020. Disponível em: <<https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/575389>>. Acesso em: 7 jul. 2024.
- MACKEH, R. et al. C2H2-Type Zinc Finger Proteins: Evolutionarily Old and New Partners of the Nuclear Hormone Receptors. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 15, p. 1550762918801071, 2018.
- MCKINNEY, W. **Data Structures for Statistical Computing in Python**. . Em: PYTHON IN SCIENCE CONFERENCE. Austin, Texas: 2010. Disponível em: <<https://conference.scipy.org/proceedings/scipy2010/mckinney.html>>. Acesso em: 25 jun. 2024
- MHIRI, C.; BORGES, F.; GRANDBASTIEN, M.-A. Specificities and Dynamics of Transposable Elements in Land Plants. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 488, 23 mar. 2022.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, jan. 2006.
- MOUGA, D. M. D. DA S. et al. Pollinic characterization of *Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae), *Dyckia brevifolia* Baker and *Dyckia ibiramensis* Reitz (Bromeliaceae), reophyte and saxicolous endemic species of river Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brazil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 4, n. 1, p. 71–82, 29 jun. 2017.
- MURAT, F.; PEER, Y. V. DE; SALSE, J. Decoding Plant and Animal Genome Plasticity from Differential Paleo-Evolutionary Patterns and Processes. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 9, p. 917–928, 1 jan. 2012.
- OLIVEIRA DE OLIVEIRA, L. et al. Molecular markers in *Carya illinoensis* (Juglandaceae): from genetic characterization to molecular breeding. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 560–569, 3 set. 2021.

OROZCO-ARIAS, S.; ISAZA, G.; GUYOT, R. Retrotransposons in Plant Genomes: Structure, Identification, and Classification through Bioinformatics and Machine Learning. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3837, jan. 2019.

PANDE, A.; ARORA, S. Molecular Strategies for Development of Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Cell & Cellular Life Sciences Journal**, v. 2, 31 jul. 2017.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PETRY, V. S. et al. Repetitive genomic elements in *Campomanesia xanthocarpa*: prospection, characterization and cross amplification of molecular markers. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 423, 28 out. 2019.

PINANGÉ, D. S. B. et al. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 1, p. 39–56, 1 jan. 2017a.

PINANGÉ, D. S. B. et al. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 1, p. 39–56, 1 jan. 2017b.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.-M. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502–503, 1 jul. 1999.

RAUWERDINK, A.; KAZLAUSKAS, R. J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Fold Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 10, p. 6153–6176, 2 out. 2015.

REHMAN, S.; MAHMOOD, T. Functional role of DREB and ERF transcription factors: regulating stress-responsive network in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 9, p. 178, 8 ago. 2015.

RIBEIRO, T. et al. Diversity of repetitive sequences within compact genomes of *Phaseolus* L. beans and allied genera *Cajanus* L. and *Vigna* Savi. **Chromosome Research**, v. 28, n. 2, p. 139–153, 1 jun. 2020.

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, 1 maio 2017.

ROGALSKI, J. M. et al. Demographic structure of clonal, endemic, and endangered rheophyte bromeliad *Dyckia ibiramensis*: asexual vs sexual reproduction. **Rodriguésia**, v. 72, p. e00752020, 3 dez. 2021.

ROLLAND, N. et al. The Biosynthetic Capacities of the Plastids and Integration Between Cytoplasmic and Chloroplast Processes. **Annual Review of Genetics**, v. 46, n. 1, p. 233–264, 2012.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 248–249, 2008.

ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 1 dez. 2017.

SABLOK, G. et al. Chloroplast genomics: Expanding resources for an evolutionary conserved miniature molecule with enigmatic applications. **Current Plant Biology**, v. 7–8, p. 34–38, nov. 2016.

SAHEBI, M. et al. Contribution of transposable elements in the plant's genome. **Gene**, v. 665, p. 155–166, jul. 2018.

SANDOVAL-PADILLA, I. et al. Complete sequence of wild *Physalis philadelphica* chloroplast genome. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 3295–3297, 3 jul. 2019.

SARZI, D. S. et al. Discovery and characterization of SSR markers in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) using low coverage genome sequencing. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20180420, 8 abr. 2019.

SATO, N. Complex origins of chloroplast membranes with photosynthetic machineries: multiple transfers of genes from divergent organisms at different times or a single endosymbiotic event? **Journal of Plant Research**, v. 133, n. 1, p. 15–33, jan. 2020.

SATO, N. Are Cyanobacteria an Ancestor of Chloroplasts or Just One of the Gene Donors for Plants and Algae? **Genes**, v. 12, n. 6, p. 823, 27 maio 2021.

SAUGUET, L. The Extended “Two-Barrel” Polymerases Superfamily: Structure, Function and Evolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 20, p. 4167–4183, 20 set. 2019.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, fev. 2000.

SCHULTE, K. et al. Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 3, p. 1105–1119, 1 dez. 2010.

SCHÜTZ, N. et al. Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 323–342, 1 jul. 2016.

SHCHERBAN, A. B. Repetitive DNA sequences in plant genomes. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 5, n. 3, p. 159–167, 1 maio 2015.

SHEIKH-ASSADI, M. et al. Complete chloroplast genome of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss and its comparative analysis: lights into selective pressure and adaptive evolution. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9375, 7 jun. 2022.

SHEU, Y. et al. Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.

SOARES, L. E. et al. Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 1 Suppl 1, p. 308–317, 2018.

- SONG, Y. et al. Function of Chloroplasts in Plant Stress Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13464, jan. 2021.
- SORK, V. L. Genomic Studies of Local Adaptation in Natural Plant Populations. **Journal of Heredity**, v. 109, n. 1, p. 3–15, 1 jan. 2018.
- SRIVASTAVA, S. et al. Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 153, dez. 2019.
- STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl\_2, p. W465–W467, 1 jul. 2005.
- STEFENON, V. M.; SARZI, D. S.; ROESCH, L. F. W. High-throughput sequencing analysis of *Eugenia uniflora*: insights into repetitive DNA, gene content and potential biotechnological applications. **3 Biotech**, v. 9, n. 5, p. 200, 3 maio 2019.
- THE GALAXY COMMUNITY. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W345–W351, 5 jul. 2022.
- TILLICH, M. et al. GeSeq – versatile and accurate annotation of organelle genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W6–W11, 3 jul. 2017.
- TYAGI, S. et al. Codon Usage Provide Insights into the Adaptation of Rice Genes under Stress Condition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1098, jan. 2023.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115–e115, ago. 2012.
- VAN OOSTERHOUT, C. et al. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.
- WAMBUGU, P. W.; NDJIONDJOP, M.-N.; HENRY, R. J. Role of genomics in promoting the utilization of plant genetic resources in genebanks. **Briefings in Functional Genomics**, v. 17, n. 3, p. 198–206, 1 maio 2018.
- WANG, X.; WANG, L. GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 13 set. 2016.
- WREGE, M. S. et al. **Atlas climático da Região Sul do Brasil - Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: [s.n.]. v. 1
- XU, J.; WANG, N. Where are we going with genomics in plant pathogenic bacteria? **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 729–736, 1 jul. 2019.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781–803, 2006.

YANG, L.; LI, Q.; ZHAO, G. Characterization of the complete chloroplast genome of *Chenopodium* sp. (Caryophyllales: Chenopodiaceae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2574–2575, 3 jul. 2019.

YAO, X. et al. Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China. **New Phytologist**, v. 176, n. 2, p. 472–480, 2007.

YEAMAN, S. et al. Conservation and divergence of gene expression plasticity following c. 140 million years of evolution in lodgepole pine (*Pinus contorta*) and interior spruce (*Picea glauca* × *Picea engelmannii*). **New Phytologist**, v. 203, n. 2, p. 578–591, 2014.

YOUNIS, A. et al. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1374, out. 2020.

ZANELLA, C. M. et al. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1020–1026, 2012.

ZHAN, J.; MEYERS, B. C. Plant Small RNAs: Their Biogenesis, Regulatory Roles, and Functions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 74, n. Volume 74, 2023, p. 21–51, 22 maio 2023.

ZHANG, F. et al. The nature and genomic landscape of repetitive DNA classes in *Chrysanthemum nankingense* shows recent genomic changes. **Annals of Botany**, v. 131, n. 1, p. 215–228, 1 jan. 2023.

ZHANG, Y. et al. The Role of Chloroplast Gene Expression in Plant Responses to Environmental Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6082, jan. 2020.

ZIESCHANK, V.; MUOLA, A.; JUNKER, R. R. **Tolerance to land-use changes through natural modulations of the plant microbiome**. bioRxiv, , 13 nov. 2023. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.11.13.566857v1>>. Acesso em: 5 mar. 2024

ZIZKA, A. et al. Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). **Diversity and Distributions**, v. 26, n. 2, p. 183–195, 2020.

## 5. CAPÍTULO II. MARCADORES MOLECULARES E ELEMENTOS REPETITIVOS EM *DYCKIA IBIRAMENSIS*, UMA ESPÉCIE ENDÊMICA

### Resumo

*Dyckia ibiramensis* é uma espécie endêmica do sul do Brasil, no estado de Santa Catarina, conhecida por sua capacidade de adaptação a variações ambientais extremas. Objetivou-se com este estudo caracterizar os elementos repetitivos presentes no genoma de *D. ibiramensis* e desenvolver marcadores microssatélites específicos para a espécie. A análise do genoma revelou uma predominância de retroelementos LTR, representando 14,74% do genoma parcial. Foram identificados 33.112 loci microssatélites, dos quais 10 foram selecionados e validados para a genotipagem de 30 indivíduos das populações naturais, mostrando alta variabilidade genética. A análise de variância molecular indicou que 93% da variação genética está presente dentro dos indivíduos. A análise de gargalos populacionais sugeriu que as populações de *D. ibiramensis* passaram por gargalos genéticos no passado. Os resultados deste estudo fornecem uma base para futuras pesquisas e estratégias de conservação da espécie.

**Palavras-chave:** Diversidade genética, Retroelementos LTR, Microssatélites, Conservação genética, Variabilidade genômica.

## MOLECULAR MARKERS AND REPETITIVE ELEMENTS IN *DYCKIA IBIRAMENSIS*, AN ENDEMIC SPECIES

### Abstract

*Dyckia ibiramensis* is an endemic species from southern Brazil, in the state of Santa Catarina, known for its ability to adapt to extreme environmental variations. This study aimed to characterize the repetitive elements present in the genome of *D. ibiramensis* and to develop species-specific microsatellite markers. Genome analysis revealed a predominance of LTR retroelements, representing 14.74% of the partial genome. A total of 33,112 microsatellite loci were identified, of which 10 were selected and validated for genotyping 30 individuals from natural populations, showing high genetic variability. Molecular variance analysis indicated that 93% of the genetic variation is present within individuals. The population bottleneck analysis suggested that *D. ibiramensis* populations have experienced ancient genetic bottlenecks. The results of this study provide a basis for future research and conservation strategies for the species.

**Keywords:** Genetic diversity, LTR retroelements, Microsatellites, Genetic conservation, Genomic variability.



## 5.1 Introdução

*Dyckia Ibiramensis* Reitz é uma espécie endêmica do sul do Brasil, no estado de Santa Catarina (REITZ, 1983), com distribuição restrita a dois quilômetros, ao longo do rio Itajaí do Norte, no município de Ibirama. Assim como outras espécies do gênero, possui uma alta adaptação às variações extremas do ambiente, podendo superar períodos de enchentes e estiagens (KRAPP; EGGLI, 2020a; PINANGÉ et al., 2017b).

Populações naturais de *Dyckia ibiramensis* estão expostas a uma série de pressões edafoclimáticas e biológicas, incluindo neste último principalmente fatores antrópicos. As plantas dessa espécie podem representar um ótimo modelo de estudo para adaptação e tolerância a diversos estresses (FLOOD; HANCOCK, 2017). Estas adaptações, por sua vez, têm caráter genético e a genômica desempenha um papel fundamental na compreensão das complexas características das espécies, permitindo uma exploração mais aprofundada e detalhada do genoma (WAMBUGU; NDJIONDJOP; HENRY, 2018). É por meio da genômica que se torna possível analisar características específicas, investigar diversidade genética intra e interpopulacional, levando a compreender inclusive, processos evolutivos que marcam a trajetória das espécies (GOSSMANN et al., 2010).

Apesar de suas características peculiares, endemismo e risco de extinção, a literatura científica contém apenas um estudo genético sobre *D. ibiramensis* (HMELJEVSKI et al., 2011b). Esse estudo avalia a diversidade e deriva genética da população utilizando marcadores isoenzimáticos. Por outro lado, os avanços dos métodos moleculares e desenvolvimento de técnicas de última geração, permitiram o aperfeiçoamento de pesquisas em áreas como taxonomia, filogenia, ecologia e genética e melhoramento de plantas (ADHIKARI et al., 2017). A obtenção de dados genômicos avançam rapidamente ao passo que as tecnologias de sequenciamento melhoram e os custos reduzem (FLOOD; HANCOCK, 2017). Por meio de sequenciamento de nova geração (NGS) e novas tecnologias computacionais é possível realizar análises rápidas e econômicas de genomas nucleares e organelares, permitindo explorar detalhadamente os recursos genômicos de uma espécie, e aplicar esses recursos em espécies não-modelo (HARRISSON et al., 2014; NAGEL et al., 2020, 2023). Isso favorece estudos e análises como a caracterização de famílias gênicas, elementos repetitivos (PETRY et al., 2019), genômica populacional e funcional (FLOOD; HANCOCK, 2017), além de colaborar no desenvolvimento de marcadores moleculares (ADHIKARI et al., 2017).

Os elementos repetitivos são sequências de DNA que aparecem em múltiplas cópias no genoma de uma espécie, variam em tamanho e composição, podendo ser encontradas em 90%

do genoma de uma planta (SHCHERBAN, 2015). Os elementos transponíveis (TEs) e DNAs satélite desempenham um papel significativo no tamanho e organização do genoma (RIBEIRO et al., 2020; ZHANG et al., 2023). Tais elementos são altamente diversos quanto a suas funções, podendo participar na regulação gênica e integridade do genoma (KRASILEVA, 2019), e sendo úteis para o desenvolvimento de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética e conservação (PETRY et al., 2019).

Retrotransposons e transposons são elementos capazes de se mover pelo genoma. Eles empregam um mecanismo de “recortar e colar”, no caso dos transposons, para se deslocar, enquanto os retrotransposons usam o “copiar e colar” para aumentar o número de cópias próprias no genoma (STEFENON; SARZI; ROESCH, 2019). É importante para as plantas possuir um genoma altamente dinâmico, pois os elementos transponíveis podem ser ativados por fatores externos, como estresses abióticos (OROZCO-ARIAS; ISAZA; GUYOT, 2019). A ativação de genes relacionados a resposta a estresses ambientais são por vezes desencadeados por transposons, principalmente se estiverem próximos a regiões regulatórias (SAHEBI et al., 2018). E embora seja conhecida essa função, em certos casos a resposta à estresses, mediada por retrotransposons por exemplo, pode ser genótipo-específico (OROZCO-ARIAS; ISAZA; GUYOT, 2019). Devido à grande ocorrência dos elementos repetitivos no genoma é possível a utilização dessas sequências como marcadores moleculares, tanto os elementos móveis (OLIVEIRA DE OLIVEIRA et al., 2021) como os DNAs satélites (PETRY et al., 2019).

Marcadores moleculares desempenham um papel importante para as estimativas e avaliações de variabilidade genética, relações filogenéticas, diversidade e deriva genética. Esse conjunto de marcadores podem atuar com precisão no mapeamento de diferentes genes ligados a características de interesse biotecnológico ou agrônômico, como tolerância a estresses abiótico e biótico, desenvolvimento fisiológico e adaptabilidade (YOUNIS et al., 2020). Diferentemente dos marcadores bioquímicos, os moleculares são mais ambientalmente estáveis, com alto polimorfismo e permitem análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (DAR; MAHAJAN; SHARMA, 2019).

Cada classe de marcadores moleculares difere entre si em termos de custos, grau de polimorfismo e precisão (GROVER; SHARMA, 2016). Os marcadores moleculares microsatélites (ou Simple Sequence Repeats – SSR) são unidades curtas de uma a cinco bases repetidas em Tandem (SRIVASTAVA et al., 2019). São locus-específicos, co-dominantes e altamente polimórficos, tornando-se assim uma valiosa ferramenta para estudos, como, genética de população (Stefenon et al., 2007), fluxo gênico (Nagel et al., 2015), conservação e

melhoramento de espécies não-modelo (LEMOS et al., 2018) ou não-cultivadas (PETRY et al., 2019).

Os marcadores microssatélites podem ser encontrados em regiões expressas e não expressas do genoma de uma espécie, podendo ser utilizados para melhoramento ou análise de genes de interesse, como os relacionados a resistência a estresses e adaptação, e estudo de genética de populações, estrutura e variação genética, respectivamente (LEMOS et al., 2018). Devido a característica de serem altamente informativos, marcadores microssatélites são amplamente usados para análises de diversidade e estrutura genética de Bromeliaceae (ZANELLA et al., 2012). Contudo, esses marcadores são espécie-específicos e apesar de seu uso entre espécies taxonomicamente próximas ser possível, essa estratégia geralmente acarreta redução do polimorfismo. Assim, o desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para *D. ibiramensis*, possibilitará o desenvolvimento de análises genéticas mais precisas e proposição de estratégias para a conservação desta espécie. Nesse contexto, por meio do sequenciamento parcial de baixa cobertura do genoma de *D. ibiramensis*, este trabalho teve por objetivo caracterizar o conteúdo de elementos repetitivos presentes no genoma e desenvolver marcadores microssatélites para a espécie.

## 5.2. Material e Métodos

### 5.2.1 Amostras vegetais

Amostras foliares de uma planta de *D. ibiramensis* proveniente de uma população natural e cultivada no Bromeliário do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, foram coletadas para isolamento de DNA e sequenciamento parcial de baixa cobertura do genoma total da espécie. Uma exsicata foi depositada no herbário Flor da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número de tombo FLOR 79881.

Além disso, amostras foliares de indivíduos adultos de *D. ibiramensis* foram coletadas em subpopulações naturais dessa espécie, no rio Itajaí do Norte, no município de Ibirama – Santa Catarina, Brasil (27°02'20''S, 49°33'46''W ~224m) para a validação dos marcadores microssatélites desenvolvidos. As subpopulações naturais de *D. ibiramensis* são pequenas e aglomeradas em rochas, com algumas rosetas originadas de propagação vegetativa (clonal). Portanto, para evitar a coleta de clones, foram selecionados indivíduos mais distantes dentro das subpopulações, resultando em uma amostragem reduzida. No total, foram coletados 30 indivíduos, provenientes de três subpopulações (10 amostras de cada população). A extração do DNA total foi realizada de acordo com o protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). A

qualidade do DNA extraído foi avaliada por meio do espectrofotômetro Nanodrop 1000® e pelo fluorômetro Qubit.

### 5.2.2 Sequenciamento parcial do genoma total

A biblioteca genômica foi preparada com os Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 e SQK-LSK112 e o sequenciamento foi executado em uma plataforma Oxford Nanopore Technologies MinION Mk1B utilizando flowcells R9.4 e R10.4, respectivamente. Utilizando os programas Guppy e Porechop foi realizado o basecalling e a limpeza das sequências, respectivamente. A montagem dos *contigs* que compõem o genoma parcial de *D. ibiramensis* foi realizado por meio do software Flye. O software REDUNDANS foi utilizado para remover contigs repetidos, devido à heterozigosidade. Todos os dados referentes ao genoma de *D. ibiramensis* estão depositados no banco de dados do Genbank/NCBI (BioProject PRJNA872198, BioSample SAMN30448151).

### 5.2.3 Caracterização dos elementos repetitivos

Elementos repetitivos genômicos dentro do genoma parcial de *D. ibiramensis* foram identificados usando o algoritmo de alinhamento Smith-Waterman, conforme implementado no programa RepeatMasker v.4.1.5. Uma base de dados, com sequências repetitivas de 77 espécies de monocotiledôneas, provenientes do Plant Repeat Database (<http://www.plantrep.cn/>) foi utilizada como referência. O RepeatMasker identifica elementos repetitivos dentro do genoma avaliado, alinhando cada uma das sequências de consulta com cada uma das sequências de consenso repetidas no arquivo da biblioteca de repetição.

### 5.2.4 Marcadores microssatélites

#### 5.2.4.1 Prospecção e caracterização

A prospecção das regiões microssatélites foi realizada utilizando o software GMata v2.3 (WANG; WANG, 2016), definido para identificar sequências com um mínimo de 10 repetições para monômeros, seis para dímeros, e cinco para trímeros, tetrâmeros e pentâmeros. Os primers para os loci SSR identificados foram desenhados visando a obtenção de alelos com tamanho variando de 200 a 400pb, utilizando o software Primer3 (UNTERGASSER et al., 2012)

#### 5.2.4.2 Validação

Primeiramente foi conduzida uma validação *in silico* dos marcadores, realizando PCR e eletroforese virtuais, utilizando o software SIMGEL, incluído no pacote SPCR (CAO et al., 2005). O principal critério para avaliação dos *primers* foi a ausência de produtos de amplificação sobrepostos. Após selecionar os *loci* potencialmente informativos, sua origem genômica (nuclear neutro, nuclear ligado a gene, plastidial ou mitocondrial) foi caracterizada através da técnica de BLAST contra o banco de dados do GenBank, utilizando o genoma de *Ananas comosus* (RefSeq GCF\_001540865.1) como referência.

Para os marcadores selecionados, *primers* foram sintetizados e inicialmente validados, em cinco amostras aleatórias para verificar sua funcionalidade e eficiência. Após a confirmação dos testes, os marcadores foram aplicados nas 30 amostras, coletadas de subpopulações naturais. Foi realizada a amplificação via PCR, utilizando aproximadamente 30 ng de DNA; 1X tampão de PCR; 0,2 µL de BSA; 0,5 µM MgCl<sub>2</sub>; 1U Taq DNA polimerase; 0,05 µM de dNTPs; 0,125 µM de cada *primer* e 0,125 µM de um primer M-13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') marcado com fluorescência, em um volume final de 15 µL. Nessa metodologia, os primers forward de todos os marcadores possuem a sequência M-13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') na posição 3', na qual se liga o primer M-13 fluorescente (SCHUELKE, 2000)

O ciclo de PCR foi composto por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos com temperatura de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 56°C por 45s, extensão a 72°C por 45s, mais oito ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 53°C por 45s, uma extensão a 72°C por 45s, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os alelos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com GelRed e visualizados sob luz UV para verificação do sucesso da amplificação. Para aqueles *loci* que geraram produtos viáveis na amplificação e eletroforese, a validação prosseguiu com a análise das 30 amostras coletadas e os alelos separados por eletroforese capilar em um equipamento ABI 3500xL Genetic Analyzer.

A genotipagem foi realizada automaticamente utilizando o software GeneMapper e realizou-se uma conferência manual dos picos de luminescência nos eletroferogramas, de modo a corrigir eventuais erros. Os alelos de cada indivíduo para cada *locus* foram registrados em uma planilha do Excel, de acordo com o tamanho (em pb) dos fragmentos.

### 5.2.3.3 Análise de diversidade genética

Os índices de diversidade genética básica foram estimados a partir dos alelos amplificados e resolvidos via eletroforese. Os índices incluíram o número total de alelos ( $A$ ), o número efetivo de alelos ( $A_e = 1/\sum p_i^2$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ), a heterozigosidade esperada não viesada ( $uHe = 2N/2N-1 \cdot He$ ), o índice de fixação ( $f = (H_e - H_o)/H_e$ ), além do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o desequilíbrio de ligação entre loci. A capacidade informativa dos marcadores microssatélites foi determinada pela estimativa da Probabilidade de Identidade (PI). Esta análise determina a probabilidade de que dois indivíduos coletados aleatoriamente dentro da amostra possuam o mesmo genótipo somente ao acaso. Os loci são adicionados um a um à análise e a PI é estimada a cada nova adição de locus. Quanto menor for a probabilidade estimada, mais informativo é o conjunto de marcadores utilizado. A estrutura genética entre as subpopulações foi estimada através da análise de variância molecular (AMOVA), conforme metodologia descrita por Excoffier et al. (1992). A análise permite particionar a diferenciação genética em três componentes: (1) entre populações, (2) entre indivíduos dentro das populações e (3) dentro dos indivíduos entre alelos em cada locus. As estimativas foram realizadas utilizando o programa GenAIEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006)

O programa GenePop on the web (ROUSSET, 2008), foi utilizado para calcular o desequilíbrio de ligação entre loci. A presença de alelos nulos e erros de genotipagem dos loci microssatélite nucleares foi verificada, com auxílio do programa Micro-Checker 2.2.4 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Adicionalmente, foi realizada uma análise para detectar redução do tamanho das populações amostradas, utilizando o software Bottleneck (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999) para as análises de excesso de heterozigotos e desvio da frequência alélica, e o software Arlequin (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) para análise M-ratio (GARZA; WILLIAMSON, 2001). Os gráficos das análises foram gerados utilizando a linguagem de programação Python, empregando a biblioteca Pandas (MCKINNEY, 2010) para a manipulação dos dados e Matplotlib (HUNTER, 2007) para a visualização gráfica.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Elementos repetitivos

A montagem do genoma de *D. ibiramensis* resultou em um total de 4.647.909 bases distribuídas em 660 contigs. Na análise dos elementos repetitivos, os retroelementos LTR foram os mais abundantes, com 1.249 elementos ocupando 655.086 bases, correspondendo a 14,74% do genoma parcial. Entre estes, os retrotransposons da classe ERV\_classI foram notáveis, com 26 elementos totalizando 4.063 bases. As repetições simples também foram amplamente

representadas, com 987 elementos cobrindo 52.213 bases, ou 1,17% do genoma parcial. Adicionalmente, os elementos de DNA compreendem 743 elementos, que abrangem 268.975 bases, representando 6,05% do genoma. Os elementos não classificados constituíram a maior categoria, com 1.214 elementos totalizando 520.727 bases, representando 11,72% do genoma parcial. Pequenos RNAs e satélites foram menos representados, com 42 e 47 elementos, ocupando 38.846 e 7.044 bases, respectivamente. A categoria de sequências de baixa complexidade somou 199 elementos, totalizando 13.348 bases, ou 0,30% do genoma parcial. Os SINEs, embora em menor número, representam 16.153 bases ao total de sequências repetitivas.

Tabela 1. Dados dos elementos repetitivos caracterizados no genoma total de *Dyckia ibiramensis*.

Elementos repetitivos	Número de elementos	Tamanho (pb)	Porcentagem das sequências
SINEs	34	16153	0,36
ALUs	0	0	0
MIRs	0	0	0
LINEs	165	50175	1,13
LINE1	121	44974	1,01
LINE2	9	577	0,01
L3/CR1	0	0	0
LTR elements	1249	655086	14,74
ERV1	1	55	0
ERV1-MaLRs	0	0	0
ERV_classI	26	4063	0,09
ERV_classII	7	1857	0,04
DNA elements	743	268975	6,05
hAT-Charlie	11	4056	0,09
TcMar-Tigger	0	0	0
Unclassified	1214	520727	11,72
Small RNA	42	38846	0,87
Satellites	47	7044	0,16
Simple repeats	987	52213	1,17
Low complexity	199	13348	0,3
Total interspersed repeats	-	1511116	34

### 5.3.2 caracterização e validação dos *loci* microssatélites

Foram identificados 33.112 *loci* microssatélites em todo o genoma. Após a caracterização e validação *in silico*, 10 marcadores foram selecionados para a genotipagem dos 30 indivíduos das subpopulações naturais (Tabela 2). Esses marcadores indicaram alto

polimorfismo, com exceção do marcador 276 na população 4, que indicou ser monomórfico (Tabela 3). Todos os 10 marcadores microssatélite selecionados são nucleares neutros.

Nos índices de diversidade genética para a população 7, os marcadores apresentaram um número de alelos ( $A$ ) variando de 2 a 11, com uma média de 5,8. Dessa população, o número efetivo de alelos ( $A_e$ ) variou de 1,471 a 8,696; a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,000 a 1,000; a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,320 a 0,885; e o índice de fixação ( $f$ ) variou de -0,818 a 1,000. Na população 6, os marcadores apresentaram um número de alelos variando de 2 a 11, com uma média de 5,8. Para essa população, o número efetivo de alelos variou de 1,105 a 8,000, a  $H_o$  de 0,100 a 1,000; a  $H_e$  de 0,095 a 0,875; e o  $f$  variou de -1,000 a 0,866. Para a população 4, os marcadores apresentaram um número de alelos variando de 1 a 11, com uma média de 6,2; o número efetivo de alelos variou de 1,000 a 8,000, a  $H_o$  de 0,000 a 1,000, a  $H_e$  de 0,000 a 0,875 e o  $f$  de -1,000 a 0,829 (Tabela 3). Aproximadamente metade dos marcadores mostrou significância estatística no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWS), indicando desvios do equilíbrio esperado nas três populações.

Tabela 2. Características dos marcadores microssatélites (SSRs) desenvolvidos para *Dyckia ibiramensis*.

Marcador	Sequência do Primer	Motivo	Tamanho do alelo sequenciado (bp)	Ta (°C)
mk142	F: TCAAAGGGGTGGATCTAACG R: GGGGTCCACATAATCCTAAC	(TA) <sub>10</sub>	311	60
mk249	F: CCCACCCCAATTACCTCTTT R: AGTGTGTGTGTGTGGAGTTG	(TA) <sub>27</sub>	356	60
mk263	F: TTCCTCTCACGTGCCTTTCT R: TTTGGAGCCAATGACGAGAT	(TA) <sub>16</sub>	257	60
mk270	F: AGCGCTTCCCTTCTTTTCAT R: GGAAGGGTGCCTCAGAAAG	(ATT) <sub>7</sub>	228	60
mk276	F: CCGGTGAGTTCTGATTCGTT R: CGAATCCAATGTGGACTTTT	(TA) <sub>11</sub>	252	60
mk295	F: AGGGTGCGTGTTCGAATAGT R: CTCCGCTGGATGAACTACCT	(GA) <sub>12</sub>	360	60
mk302	F: GCAACCATGTGTGGCATATT R: GCCTACGCGACCTTTTCTCT	(TC) <sub>12</sub>	365	60
mk315	F: TCGAGCACAGCATGAAGTTT R: CCAAATAATTGCCCAACCAG	(TA) <sub>13</sub>	377	60
mk320	F: CAGGTTGAGCATCTCTCTCTC R: ACTCTCCGCCGTTTCTTTT	(TC) <sub>16</sub>	281	60
mk343	F: TTGGTGCTGCATAGCTCAAC R: TTCGAATCCTTGTCGATTA	(AG) <sub>8</sub>	366	60

Ta: Temperatura de anelamento



Tabela 3. Caracterização genética dos dez *loci* microssatélites desenvolvidos para *Dyckia ibiramensis*.

Pop	Locus	N	A	Ae	I	Ho	He	uHe	f	HWS
<b>Pop7</b>	mk295	9	7,000	3,447	1,519	0,889	0,710	0,752	-0,252	0,253 <sup>ns</sup>
	mk343	10	7,000	4,167	1,653	1,000	0,760	0,800	-0,316	0,045*
	mk249	10	11,000	8,696	2,276	0,900	0,885	0,932	-0,017	0,043*
	mk320	10	2,000	1,980	0,688	0,900	0,495	0,521	-0,818	0,010**
	mk276	10	2,000	1,471	0,500	0,000	0,320	0,337	1,000	0,002**
	mk302	10	4,000	3,333	1,280	0,000	0,700	0,737	1,000	0,000***
	mk263	10	9,000	6,061	1,983	0,800	0,835	0,879	0,042	0,149 <sup>ns</sup>
	mk315	10	7,000	3,774	1,608	1,000	0,735	0,774	-0,361	0,814 <sup>ns</sup>
	mk270	9	4,000	3,176	1,228	0,778	0,685	0,725	-0,135	0,006**
	mk142	9	5,000	3,767	1,456	0,556	0,735	0,778	0,244	0,353 <sup>ns</sup>
<b>Mean</b>		<b>9,700</b>	<b>5,800</b>	<b>3,987</b>	<b>1,419</b>	<b>0,682</b>	<b>0,686</b>	<b>0,723</b>	<b>0,039</b>	-
<b>Pop6</b>	mk295	10	10,000	4,545	1,887	0,600	0,780	0,821	0,231	0,206 <sup>ns</sup>
	mk343	10	5,000	3,390	1,383	1,000	0,705	0,742	-0,418	0,206 <sup>ns</sup>
	mk249	10	11,000	8,000	2,233	0,700	0,875	0,921	0,200	0,084 <sup>ns</sup>
	mk320	9	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,529	-1,000	0,003**
	mk276	10	2,000	1,105	0,199	0,100	0,095	0,100	-0,053	0,868 <sup>ns</sup>
	mk302	10	6,000	3,922	1,554	0,100	0,745	0,784	0,866	0,000***
	mk263	10	9,000	6,250	1,987	0,900	0,840	0,884	-0,071	0,940 <sup>ns</sup>
	mk315	10	4,000	2,941	1,221	1,000	0,660	0,695	-0,515	0,125 <sup>ns</sup>
	mk270	10	6,000	4,545	1,639	1,000	0,780	0,821	-0,282	0,012*
	mk142	10	3,000	2,020	0,857	0,500	0,505	0,532	0,010	0,009**
<b>Mean</b>		<b>9,900</b>	<b>5,800</b>	<b>3,872</b>	<b>1,365</b>	<b>0,690</b>	<b>0,649</b>	<b>0,683</b>	<b>-0,103</b>	-
<b>Pop4</b>	mk295	10	11,000	7,692	2,221	0,800	0,870	0,916	0,080	0,184 <sup>ns</sup>
	mk343	10	8,000	4,651	1,774	1,000	0,785	0,826	-0,274	0,286 <sup>ns</sup>
	mk249	10	11,000	8,000	2,247	0,800	0,875	0,921	0,086	0,084 <sup>ns</sup>
	mk320	9	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,529	-1,000	0,003**
	mk276	10	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	#N/D	-
	mk302	9	6,000	2,842	1,380	0,111	0,648	0,686	0,829	0,000***
	mk263	10	7,000	3,704	1,557	0,900	0,730	0,768	-0,233	0,444 <sup>ns</sup>
	mk315	10	4,000	3,279	1,288	1,000	0,695	0,732	-0,439	0,244 <sup>ns</sup>
	mk270	10	8,000	5,405	1,844	1,000	0,815	0,858	-0,227	0,326 <sup>ns</sup>
	mk142	9	4,000	2,746	1,132	0,333	0,636	0,673	0,476	0,100 <sup>ns</sup>
<b>Mean</b>		<b>9,700</b>	<b>6,200</b>	<b>4,132</b>	<b>1,414</b>	<b>0,694</b>	<b>0,655</b>	<b>0,691</b>	<b>-0,078</b>	-

N: número de indivíduos genotipados; A: Número de alelos; Ae: número efetivo de alelos; I: índice de Shannon; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; uHe: heterozigosidade esperada não enviesada; f: índice de fixação; HWS: Probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Ns: Sem significância, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

A análise de probabilidade de identidade revelou uma diminuição com a adição de mais marcadores, independentemente da população analisada. A probabilidade de Identidade entre os indivíduos adultos (PIExc) e entre eventuais progênies (PIsibs) mostram uma tendência decrescente similar na probabilidade de identidade à medida que o número de marcadores

combinados aumenta. Inicialmente, com apenas um marcador, a probabilidade de identidade é relativamente alta, próxima de  $1E-01$  para todas as populações. À medida que os loci são combinados, essa probabilidade cai drasticamente. Com a combinação de três marcadores (1+2+3), a probabilidade de identidade já está em torno de  $1E-04$  para todas as populações (Figura 2).

À medida que mais marcadores são adicionados, a probabilidade de identidade continua a diminuir, alcançando aproximadamente  $1E-08$  com a combinação de todos os dez marcadores (1+2+3+4+5+6+7+8+9+10) tanto para adultos quanto para progênies (PIExc e PIsibs, respectivamente).

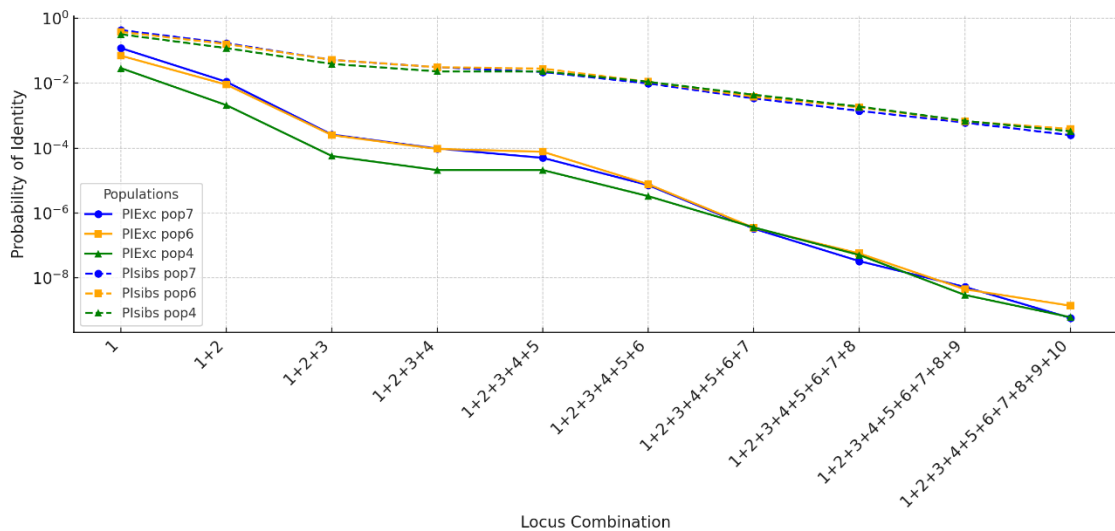


Figura 2. Probabilidade de identidade para diferentes combinações de marcadores nas populações de *Dyckia ibiramensis*

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que 1% da variação genética foi atribuída a diferenças entre as populações (Among Pops), 6% a diferenças entre indivíduos dentro das populações (Among Indiv) e 93% à variação dentro dos indivíduos (Within Indiv) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância molecular usando os dez marcadores SSRs desenvolvidos para *Dyckia ibiramensis*, em três subpopulações.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
<b>Among Pops</b>	2	9,000	4,500	0,036	1%
<b>Among Indiv</b>	27	102,200	3,785	0,209	6%
<b>Within Indiv</b>	30	101,000	3,367	3,367	93%
<b>Total</b>	59	212,200		3,612	100%

O índice de Shannon (Figura 1A) revelou que 13% da variação genética está entre as populações (Among Pops), enquanto 87% da variação genética está dentro das populações (Within Pops), indicando que a maior parte da variabilidade genética é intra-populacional. A escala de diversidade e sobreposição (Figura 1B) mostrou que a diversidade ( $D'$ ) é maior dentro das populações, com uma menor sobreposição ( $O'=1-D'$ ) entre as populações. Esses resultados destacam que a variabilidade genética em *D. ibiramensis* é predominantemente encontrada dentro das populações, com uma menor proporção de variabilidade entre as populações.

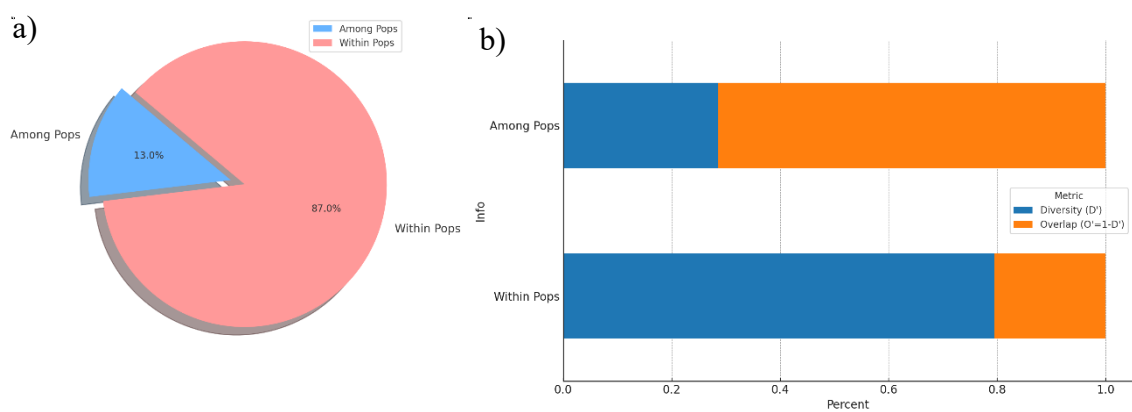


Figura 1. Índice de Shannon(a), escala de diversidade e sobreposição (b) entre as populações na avaliação da diversidade genética em *Dyckia ibiramensis*.

A análise com o software Micro-Checker sugeriu a presença de alelos nulos nos marcadores 276 e 302. Esses marcadores mostraram evidências de alelos nulos, conforme indicado pelos diferentes testes aplicados. A estimativa de desequilíbrio de ligação entre os pares de marcadores nas populações de *D. ibiramensis* demonstrou vários pares em desequilíbrio de ligação. Foram observados p-values inferiores a 0.05 em diversas combinações de loci nas populações analisadas, destacando pares como mk295-mk343, mk343-mk276, mk343-mk302, mk276-mk302, mk295-mk270, mk302-mk270, mk343-mk249, mk315-mk270, mk295-mk142, mk263-mk142 e mk270-mk142 (Tabela 5). Para as estimativas em todas as populações nenhum dos pares de marcadores apresentados possui  $p$ -value menor que 0.05, indicando que não há pares de marcadores fisicamente ligados e que a significância para o desequilíbrio de ligação nas populações analisadas está relacionada à sua dinâmica evolutiva, como déficit de heterozigotos ou endogamia.

Tabela 5. Estimativa de desequilíbrio de ligação entre os pares de marcadores desenvolvidos para *Dyckia ibiramensis*.

<b>Pares de Loci</b>	<b>População</b>	<b>P-Value</b>
mk295-mk343	pop7	0.014
mk343-mk276	pop7	0.005
mk343-mk302	pop7	0.009
mk276-mk302	pop7	0.003
mk295-mk270	pop6	0.004
mk302-mk270	pop6	0.004
mk343-mk249	pop4	0.022
mk343-mk302	pop4	0.012
mk302-mk315	pop4	0.009
mk315-mk270	pop4	0.003
mk295-mk142	pop4	0.012
mk263-mk142	pop4	0.008
mk270-mk142	pop4	0.008

A análise de redução populacional foi realizada utilizando o programa Bottleneck, considerando os modelos de mutação infinita (IAM) e passo a passo (SMM) (Tabela 6). O teste de Wilcoxon para a população 7 demonstrou que, sob o modelo IAM, houve significância estatística ( $p = 0,01$ ), com 8 loci apresentando excesso de heterozigotos, no entanto, sob o modelo SMM, o valor de  $p$  foi 0,50. Para a população 6, o teste de Wilcoxon não indicou significância estatística em nenhum dos modelos (IAM,  $p = 0,18$ ; SMM,  $p = 0,68$ ), com 8 loci apresentando excesso de heterozigotos. Da mesma forma, a população 4 não apresentou significância estatística sob ambos os modelos (IAM,  $p = 0,10$ ; SMM,  $p = 0,87$ ), com 6 loci apresentando excesso de heterozigotos. A distribuição das frequências alélicas (Figura 3) nas três populações mostrou uma forma em "L", característica de populações em equilíbrio entre deriva-mutação. Por outro lado, os valores de M-ratio para todas as populações foram menores que 0,68, indicando uma redução populacional (bottleneck) para as três populações analisadas.

Tabela 6. Indicadores de bottleneck em populações de *Dyckia ibiramensis*.

População	$N(H_e > H_{eq})$	Wilcoxon test (p-value)		M-ratio
		IAM	SMM	
pop7	8	0.01	0.50	0.363
pop6	8	0.18	0.68	0.306
pop4	6	0.10	0.87	0.332

O número de loci com excesso de heterozigotos ( $N(H_e > H_{eq})$ ) é apresentado para cada população, juntamente com os valores de p obtidos no teste de Wilcoxon, aplicados aos modelos de mutação infinita (IAM) e de passo a passo (SMM). Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Na análise de M-ratio, valores abaixo de 0,68 foram considerados indicativos de gargalo genético.

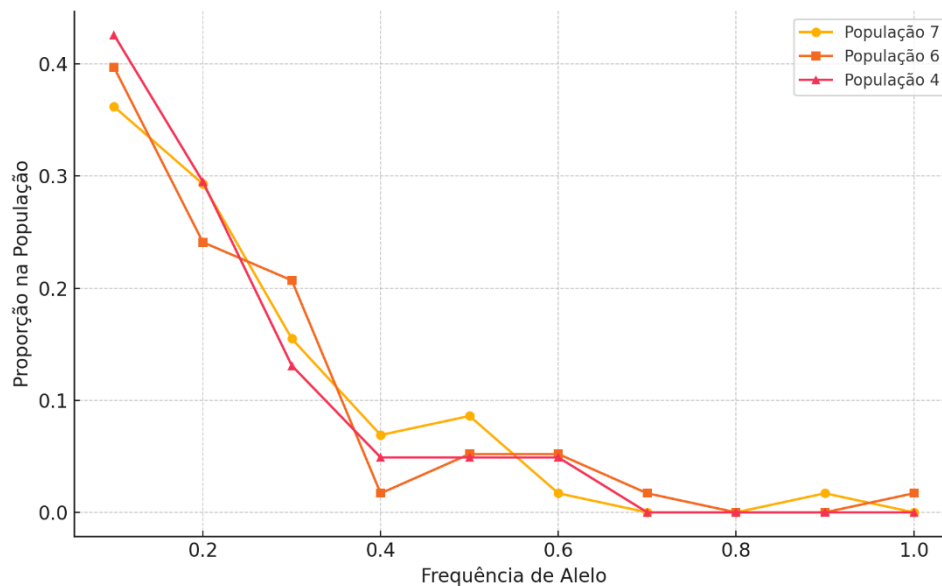


Figura 3. Padrões de frequência alélica em populações de *Dyckia ibiramensis*, com indícios de bottleneck.

## 5.4 Discussão

O objetivo deste estudo foi caracterizar os elementos repetitivos presentes no genoma de *D. ibiramensis* e desenvolver marcadores microsatélites para avaliar a diversidade genética das populações naturais. Os resultados obtidos fornecem informações sobre a estrutura genômica e a variabilidade genética da espécie, contribuindo para estratégias de conservação.

A predominância de retroelementos LTR (Tabela 1), que representam 14,74% do genoma parcial, destaca a importância desses elementos na estruturação e evolução do genoma de *D. ibiramensis*. Retrotransposons, como os ERV\_classI, são conhecidos por sua capacidade de mobilidade, o que pode promover a diversidade genética e a adaptabilidade a condições ambientais extremas (HASSAN; MOKHTAR; EL ALLALI, 2024). A elevada proporção desses elementos sugere que eles desempenham um papel vital na resposta rápida a mudanças ambientais, conferindo uma vantagem adaptativa à espécie (MHIRI; BORGES;

GRANDBASTIEN, 2022; OROZCO-ARIAS; ISAZA; GUYOT, 2019). As repetições simples (Tabela 1), que constituem 1,17% do genoma, e os elementos de DNA, que ocupam 6,05%, são importantes para a regulação gênica e a estabilidade genômica (KRASILEVA, 2019; RIBEIRO et al., 2020). Essas características são consistentes com observações em outras espécies de Bromeliaceae, onde elementos repetitivos contribuem para a regulação e adaptação genômica (LIN; SHARMA; YU, 2021). A presença de elementos não classificados em 11,72% do genoma aponta para a complexidade genômica de *D. ibiramensis* (SHCHERBAN, 2015) e a necessidade de estudos adicionais para compreender melhor essas sequências. Pequenos RNAs e satélites desempenham papéis importantes na regulação pós-transcricional e na estrutura cromossômica, respectivamente (GARRIDO-RAMOS, 2021; LI et al., 2017; ZHAN; MEYERS, 2023), embora sejam menos representados no genoma de *D. ibiramensis*. Os SINEs, embora em menor número, influenciam a regulação gênica e contribuem para a plasticidade genômica (MAAGD; WIEL; SCHOUTEN, 2020; MURAT; PEER; SALSE, 2012), o que é particularmente relevante para a adaptação e a sobrevivência de *D. ibiramensis* no ambiente variável ao qual está inserida.

Estudos em outras bromeliáceas, como o abacaxi (*Ananas comosus*), indicam tanto similaridades quanto diferenças na estrutura genômica e na variabilidade genética. Em *A. comosus*, foram identificados elementos repetitivos similares aos encontrados em *D. ibiramensis*, como retrotransposons e microssatélites, demonstrando uma forte presença desses elementos no genoma (FANG et al., 2016; LIN; MING, 2018; LIU; GUYOT; MING, 2018). Da mesma forma, em *Puya*, estudos indicam alta variabilidade genética e a alta presença de elementos repetitivos, destacando a complexidade genômica dessas plantas (HORNUNG-LEONI et al., 2013; SCHULTE et al., 2010).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos neste estudo demonstraram alta variabilidade genética (Tabelas 2 e 3), essencial para a adaptabilidade da espécie. A identificação de 33.112 loci microssatélites e a seleção de 10 para genotipagem destacam o potencial desses marcadores para estudos de diversidade genética e conservação (Tabela 2). Essa variabilidade é fundamental para a resposta adaptativa da espécie a pressões ambientais e mudanças climáticas (FISCHER et al., 2017). Os índices de diversidade genética para as populações naturais de *D. ibiramensis* foram elevados (Tabela 3), com um número médio de alelos ( $A$ ) variando entre 5,8 e 6,2, a heterozigosidade esperada ( $He$ ) variando de 0,320 a 0,885 e heterozigosidade observada ( $Ho$ ) foi, em média, 0,682 para a Pop7, 0,690 para a Pop6 e 0,694 para a Pop4. Esses índices refletem uma boa variabilidade genética nas populações, sugerindo que as mesmas possuem uma base genética relativamente ampla para enfrentar pressões ambientais. No entanto, aproximadamente metade dos marcadores mostrou desvios

significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (Tabela 3), indicando possíveis pressões seletivas, deriva genética e estruturação populacional. Esses desvios podem ser atribuídos à seleção natural, que favorece certos genótipos, ou à deriva genética em populações pequenas e isoladas (GONZÁLEZ-ASTORGA et al., 2004; SHEU et al., 2017; SOARES et al., 2018). A estruturação populacional é evidente, já que a espécie é endêmica e suas populações estão geograficamente restritas (HMELJEVSKI et al., 2011b).

A média do índice de fixação ( $f$ ) (Tabela 3) foi de 0,039 para a Pop7, -0,103 para a Pop6 e -0,078 para a Pop4. Esses valores indicam que, enquanto algumas populações apresentam sinais de homozigose ( $f$  positivo), outras podem estar se beneficiando de um fluxo gênico mais diversificado ( $f$  negativo). A Pop7, com um índice de fixação positivo, pode estar experimentando maior homozigose, possivelmente devido à fragmentação do habitat e ao isolamento geográfico. Já a Pop6 e a Pop4, com índices negativos, podem estar beneficiando-se de um fluxo gênico mais diversificado, possivelmente facilitado por eventos de dispersão. Comparando com estudos anteriores, Hmeljevski et al. (2011) utilizaram marcadores isoenzimáticos e revelaram um baixo nível de diversidade genética ( $He = 0,219$ ) e elevado nível de fixação ( $f = 0,642$ ) em *D. ibiramensis*. A diversidade genética observada neste estudo com microssatélites é consideravelmente maior, o que pode ser atribuído à maior sensibilidade e precisão dos microssatélites em detectar variabilidade genética. Até o presente momento, nenhum estudo genômico para a espécie havia sido realizado. Este trabalho, portanto, preenche uma lacuna no conhecimento genético da espécie, proporcionando dados fundamentais para futuras pesquisas e esforços de conservação.

A elevada heterozigosidade observada nas populações naturais de *D. ibiramensis* sugere que a espécie possui uma alta variabilidade genética (Tabela 3), importante para a adaptação a pressões ambientais e para a resiliência a eventos aleatórios (GOMES et al., 2020). No entanto, os desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg indicam que fatores como a deriva genética e a seleção natural estão influenciando a estrutura genética das populações.

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a maior parte da variabilidade genética em *D. ibiramensis* está presente dentro dos indivíduos (93%), com uma menor proporção entre populações (1%) e entre indivíduos dentro das populações (6%). Esse padrão sugere que há uma alta diversidade genética intra-individual, o que pode ser uma estratégia adaptativa para a sobrevivência em ambientes oscilatórios e fragmentados (GODOY et al., 2018). A predominância da variação genética dentro dos indivíduos de *D. ibiramensis* pode ser atribuída à reprodução sexuada e à alta taxa de mutações e recombinações genéticas

que ocorrem dentro dos indivíduos (HMELJEVSKI et al., 2011b). Em outras Bromeliaceae, como *Dyckia* e *Puya*, a variabilidade genética é mantida principalmente pela reprodução sexuada, que aumenta a diversidade genética intra-individual e intra-populacional (MOUGA et al., 2017; ROGALSKI et al., 2021).

O Índice de Shannon revelou que a maior parte da diversidade genética está dentro das populações (87%), reforçando a necessidade de focar na conservação intra-populacional. A diversidade genética dentro das populações é fundamental para a adaptabilidade e resiliência da espécie a pressões ambientais (BOOY et al., 2000). Estudos sobre a diversidade genética em *Puya raimondii* e *Dyckia brevifolia* destacam uma alta diversidade genética intra-populacional. Em *P. raimondii*, análises genéticas mostraram uma diversidade genética considerável, sugerindo um padrão adaptativo importante para a sobrevivência em ambientes extremos (HORNUNG-LEONI et al., 2013). Similarmente, *D. brevifolia* apresentou alta diversidade genética entre suas populações, indicando uma estrutura genética complexa e a importância da diversidade genética para a conservação da espécie (ROGALSKI et al., 2017).

A reduzida probabilidade de identidade com a adição de mais marcadores confirma a eficácia dos microssatélites desenvolvidos neste estudo. Essa alta resolução genética é essencial para distinguir entre indivíduos geneticamente semelhantes, proporcionando uma ferramenta robusta para estudos de conservação genética. A aplicação de múltiplos marcadores é especialmente relevante em espécies com populações pequenas e fragmentadas, onde a precisão na identificação genética pode orientar esforços de conservação e manejo (YAO et al., 2007). A presença de alelos nulos e o desequilíbrio de ligação observados indicam possíveis limitações nos marcadores desenvolvidos. No entanto, deve-se levar em consideração, também, outros índices estimados para se determinar esses elementos. O tamanho relativamente reduzido das subpopulações, as quais podem ainda incluir indivíduos endogâmicos pode ser um fator relevante na redução da heterozigosidade observada neste estudo. Este fator, por sua vez, pode ter contribuído com a estimativa de presença de alelos nulos, que se relaciona com a ausência de amplificação de um alelo no locus em questão devido a uma mutação na região de anelamento do primer, apesar da presença da região microssatélite. Desta forma, gera-se um genótipo homozigoto quando deveria ser expressa a heterozigosidade. Com relação à ligação entre os loci, representada pela análise do desequilíbrio de ligação, diferentes fatores como endogamia e deriva genética (devido ao pequeno tamanho populacional) podem gerar uma falsa ligação entre loci em algumas populações, mas não em outras. Este é o fato observado nesta análise, em que alguns pares de loci apresentam em desequilíbrio em uma população, mas não em outras e nenhum par de loci apresenta desequilíbrio na análise geral (todas as populações).



Além disso, durante a caracterização dos loci a serem utilizados no desenvolvimento dos marcadores microssatélite, foram selecionados loci que estavam localizados em *contigs* diferentes e que foram mapeados contra diferentes cromossomos no genoma referência de abacaxi. Assim, a probabilidade de se ter selecionado *loci* fisicamente ligados foi extremamente reduzida nas etapas iniciais do desenvolvimento dos marcadores. Por outro lado, esses resultados também destacam a complexidade genética de *D. ibiramensis* e a necessidade de um monitoramento contínuo para entender melhor a dinâmica populacional e os fatores que influenciam a variação genética.

A alta variabilidade genética observada dentro das populações e indivíduos sugere que estratégias de conservação devem focar na conservação de habitats e na manutenção de populações geneticamente diversas. A similaridade dos padrões de variabilidade genética com outras Bromeliaceae reforça a importância de estratégias de conservação integradas para esse grupo de plantas.

A análise dos dados de redução populacional (Tabela 6 e Figura 3), indicam que as populações de *D. ibiramensis* passaram por gargalos genéticos. Os valores de *M-ratio* menores que 0,68 (GARZA; WILLIAMSON, 2001) para todas as populações analisadas sugerem que as populações sofreram eventos de *bottleneck* no passado. Os métodos utilizados neste estudo cobrem intervalos de tempo diferentes e complementares, medidos com gerações em relação ao tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ). Assim, assinaturas de gargalo genético em um intervalo de  $0,2 N_e$  a mais do que  $4,0 N_e$  gerações são captadas nestas análises. Somente a análise da razão *M* (que se baseia na proporção entre os alelos observados e o esperado caso a população não tivesse sofrido o gargalo genético) apresentou evidência de ocorrência de redução populacional. Contudo, a assinatura de redução populacional capturada por esta análises se refere a eventos ocorridos há mais do que  $4,0 N_e$  gerações (GARZA; WILLIAMSON, 2001). Esses gargalos podem ter sido causados por eventos climáticos extremos ou pressão antrópica, resultando em uma redução temporária no tamanho da população, perda de variabilidade genética, perda de alelos raros, redução da heterozigosidade e aumento da homozigose, comprometendo a integridade genética e a capacidade adaptativa das populações. Além dos eventos históricos de gargalo genético, recentemente, enchentes na região de Ibirama-SC causaram a perda de um número significativo de indivíduos dessa espécie, exacerbando a redução populacional e elevando o risco de extinção. Um estudo baseado na genotipagem de uma amostragem mais ampla de subpopulações e indivíduos com esses marcadores microssatélites permitirá estimar o tamanho populacional efetivo de *D. ibiramensis* e determinar mais precisamente o tempo de ocorrência do gargalo genético evidenciado na presente análise.

A espécie *D. ibiramensis* é endêmica de uma área muito restrita no sul do Brasil, tornando-a particularmente vulnerável a eventos aleatórios e mudanças ambientais. Esse endemismo, combinado com a fragmentação do habitat e a redução do tamanho populacional, coloca a espécie em um alto risco de extinção. De acordo com o Centro Nacional de Conservação da Flora em 2013 e o Ministério do Meio Ambiente em 2022, a *D. ibiramensis* é classificada como em perigo (EN), enquanto o Conselho Estadual de Meio Ambiente de Santa Catarina em 2014 a classifica como Criticamente em Perigo (CR). A espécie não consta na lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* – IUCN. A variabilidade genética é um fator essencial para a sobrevivência a longo prazo, pois permite que as populações se adaptem a novos desafios ambientais e resistam a pressões seletivas.

Os resultados deste estudo têm importantes implicações para a conservação de *D. ibiramensis*. A caracterização dos elementos repetitivos e dos marcadores microsatélites oferece uma base sólida para monitorar a diversidade genética ao longo do tempo, permitindo a identificação de indivíduos geneticamente diversos que podem ser prioritários em programas de reprodução e reintrodução. A aplicação desses marcadores em outras espécies do gênero *Dyckia* pode fornecer informações adicionais sobre a evolução e diversidade genética dessas plantas, contribuindo para a formulação de estratégias de conservação mais abrangentes. Além disso, estudos anteriores sobre *D. ibiramensis* sugeriram que a espécie passou por eventos de gargalo genético, indicando possíveis reduções populacionais e deriva genética (HMELJEVSKI et al., 2011b). Nosso estudo aponta para a ocorrência de gargalos genéticos, embora uma análise mais abrangente e precisa das populações seja necessária.

A coleta de amostras para este estudo enfrentou desafios, devido à estrutura das populações de *D. ibiramensis*. Os indivíduos estão frequentemente muito agrupados em uma única rocha e muitas vezes se propagam vegetativamente, o que aumenta o risco de coletar clones. Para evitar isso, selecionamos amostras de indivíduos mais distantes, resultando em uma amostragem reduzida. Embora essa estratégia tenha sido adequada para testar a informatividade dos marcadores, uma amostragem maior e um estudo específico de diversidade e estrutura genética são necessários para obter conclusões mais detalhadas sobre o estado de conservação de *D. ibiramensis*.

## 5.5 Conclusão

A caracterização dos elementos repetitivos no genoma de *Dyckia ibiramensis* e o desenvolvimento de marcadores microsatélites específicos forneceram informações detalhadas sobre a estrutura e variabilidade genética da espécie. A predominância de

retroelementos LTR destaca sua função na evolução genômica, enquanto os marcadores microssatélites identificados mostram alta variabilidade genética, essencial para a adaptabilidade e tolerância da espécie. A variabilidade genética dentro das populações e indivíduos indica uma capacidade de adaptação e sobrevivência. Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e os gargalos populacionais observados apontam para a necessidade de estratégias de conservação que preservem a diversidade genética e os habitats naturais. Os resultados deste estudo fornecem informações essenciais para futuras pesquisas, contribuindo para o entendimento genômico de *D. ibiramensis* e estabelecendo bases para a conservação da espécie.

## 5.6. Referências

ADHIKARI, S. et al. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **The Nucleus**, v. 60, n. 3, p. 283–297, 1 dez. 2017.

ANTAR, G. M. et al. Novelties in *Dyckia* (Pitcairnioideae - Bromeliaceae) from the South America dry diagonal: Two new species, a new combination and a new name. **Feddes Repertorium**, v. 132, n. 3, p. 269–278, 2021.

ANTONELLI, A. The rise and fall of Neotropical biodiversity. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 199, n. 1, p. 8–24, 1 maio 2022.

BAYLY, M. J. et al. Chloroplast genome analysis of Australian eucalypts – *Eucalyptus*, *Corymbia*, *Angophora*, *Allosyncarpia* and *Stockwellia* (Myrtaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 704–716, 1 dez. 2013.

BIGOT, S. et al. Pivotal roles of environmental sensing and signaling mechanisms in plant responses to climate change. **Global Change Biology**, v. 24, n. 12, p. 5573–5589, 2018.

BOGAMUWA, S. P.; JANG, J.-C. Tandem CCCH zinc finger proteins in plant growth, development and stress response. **Plant & Cell Physiology**, v. 55, n. 8, p. 1367–1375, ago. 2014.

BOOY, G. et al. Genetic Diversity and the Survival of Populations. **Plant Biology**, v. 2, n. 4, p. 379–395, 2000.

CHAN, P. P.; LOWE, T. M. tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1962, p. 1–14, 2019.

CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. The zinc finger network of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7, p. 1150–1160, 1 abr. 2008.

COX, R. L.; UNDERWOOD, E. C. The Importance of Conserving Biodiversity Outside of Protected Areas in Mediterranean Ecosystems. **PLOS ONE**, v. 6, n. 1, p. e14508, 7 jan. 2011.

DAR, A.; MAHAJAN, R.; SHARMA, S. Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 89, p. 1755–1763, 1 nov. 2019.

DARLING, A. C. E. et al. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394–1403, jul. 2004.

DAVIES, P. M. Climate Change Implications for River Restoration in Global Biodiversity Hotspots. **Restoration Ecology**, v. 18, n. 3, p. 261–268, 2010.

DOBROGOJSKI, J.; ADAMIEC, M.; LUCIŃSKI, R. The chloroplast genome: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 6, p. 98, 18 maio 2020.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. (EDS.). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **PHYTOCHEMICAL BULLETIN**, [s.d.].

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FANG, J. et al. Genome-Wide Comparative Analysis of Microsatellites in Pineapple. **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 117–135, 1 set. 2016.

FISCHER, M. C. et al. Estimating genomic diversity and population differentiation – an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 69, 11 jan. 2017.

FLANAGAN, S. P. et al. Guidelines for planning genomic assessment and monitoring of locally adaptive variation to inform species conservation. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 7, p. 1035–1052, 2018.

FLOOD, P. J.; HANCOCK, A. M. The genomic basis of adaptation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 36, p. 88–94, abr. 2017.

FU, M. et al. OTP970 Is Required for RNA Editing of Chloroplast *ndhB* Transcripts in *Arabidopsis thaliana*. **Genes**, v. 13, n. 1, p. 139, jan. 2022.

GAO, L.-Z. et al. Evolution of *Oryza* chloroplast genomes promoted adaptation to diverse ecological habitats. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 278, 26 jul. 2019.

GARRIDO-RAMOS, M. A. The Genomics of Plant Satellite DNA. Em: UGARKOVIĆ, Đ. (Ed.). **Satellite DNAs in Physiology and Evolution**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 103–143.

GARZA, J. C.; WILLIAMSON, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 305–318, fev. 2001.

GIVNISH, T. et al. Phylogeny, Adaptive Radiation, and Historical Biogeography of Bromeliaceae Inferred from *ndhF* Sequence Data. **Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany**, v. 23, n. 1, p. 3–26, 1 dez. 2007.

GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872–895, 2011.

GODOY, F. M. DE R. et al. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 187, n. 4, p. 672–688, 27 jul. 2018.

GOMES, A. C. et al. Adaptive response of extreme epiphyte *Tillandsia* species (Bromeliaceae) is demonstrated by different sexual reproduction strategies in the Brazilian Chaco. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 4, p. 840–854, 27 mar. 2020.

GOMES-DA-SILVA, J.; SANTOS-SILVA, F.; FORZZA, R. C. Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 5, p. 467–490, 4 jul. 2019a.

GOMES-DA-SILVA, J.; SANTOS-SILVA, F.; FORZZA, R. C. Does nomenclatural stability justify para/polyphyletic taxa? A phylogenetic classification in the xeric clade Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 17, n. 5, p. 467–490, 4 jul. 2019b.

GONZÁLEZ-ASTORGA, J. et al. Diversity and Genetic Structure of the Mexican Endemic Epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). **Annals of Botany**, v. 94, n. 4, p. 545–551, out. 2004.

GOSSMANN, T. I. et al. Genome Wide Analyses Reveal Little Evidence for Adaptive Evolution in Many Plant Species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 8, p. 1822–1832, 1 ago. 2010.

GÖTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 1 jun. 2008.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290–302, 3 mar. 2016.

HARRISSON, K. A. et al. Using genomics to characterize evolutionary potential for conservation of wild populations. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 9, p. 1008–1025, 2014.

HASSAN, A. H.; MOKHTAR, M. M.; ELALLALI, A. Transposable elements: multifunctional players in the plant genome. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 4 jan. 2024.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6, p. 445–600, 1995.

HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761–769, 1 jun. 2011a.

HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761–769, 1 jun. 2011b.

HORNUNG-LEONI, C. T. et al. Genetic variation in the emblematic *Puya raimondii* (Bromeliaceae) from Huascarán National Park, Peru. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 67–74, mar. 2013.

HUNTER, J. The Matplotlib User's Guide. [s.d.].

IGAMBERDIEV, A. U.; BYKOVA, N. V. Role of organic acids in the integration of cellular redox metabolism and mediation of redox signalling in photosynthetic tissues of higher plants. **Free Radical Biology and Medicine**, Redox Signalling in Plants and Implications for Mammalian Physiology. v. 122, p. 74–85, 1 jul. 2018.

JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459–473, 2014.

KRAPP, F. et al. A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 12, p. e470–e473, 2012.

KRAPP, F. et al. Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 7, p. 1591–1614, 1 ago. 2014.

KRAPP, F.; EGGLI, U. *Dyckia* BROMELIACEAE. Em: EGGLI, U.; NYFFELER, R. (Eds.). **Monocotyledons**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020a. p. 893–962.

KRAPP, F.; EGGLI, U. *Dyckia* BROMELIACEAE. Em: EGGLI, U.; NYFFELER, R. (Eds.). **Monocotyledons**. Illustrated Handbook of Succulent Plants. Berlin, Heidelberg: Springer, 2020b. p. 893–962.

KRASILEVA, K. V. The role of transposable elements and DNA damage repair mechanisms in gene duplications and gene fusions in plant genomes. **Current Opinion in Plant Biology**, Genome studies and molecular genetics. v. 48, p. 18–25, 1 abr. 2019.

LASLETT, D.; CANBACK, B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 11–16, 2004.

LEMOS, R. P. M. et al. Characterization of Plastidial and Nuclear SSR Markers for Understanding Invasion Histories and Genetic Diversity of *Schinus molle* L. **Biology**, v. 7, n. 3, p. 43, set. 2018.

LI, S. et al. The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 654–670, 2017.

LIN, J.; MING, R. Sequencing and Assembly of the Pineapple Genome. Em: MING, R. (Ed.). **Genetics and Genomics of Pineapple**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 97–107.

LIN, L.; SHARMA, A.; YU, Q. Recent amplification of microsatellite-associated miniature inverted-repeat transposable elements in the pineapple genome. **BMC Plant Biology**, v. 21, p. 424, 18 set. 2021.

LIU, J.; GUYOT, R.; MING, R. Transposable Elements in the Pineapple Genome. Em: MING, R. (Ed.). **Genetics and Genomics of Pineapple**. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 22p. 155–165.

LIU, L. et al. Draft genome of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the Queen of the Andes. **Genomics**, v. 113, n. 4, p. 2537–2546, 1 jul. 2021.

LOHSE, M. et al. OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W575-581, jul. 2013.

MAAGD, R. A. DE; WIEL, C. C. M. VAN DE; SCHOUTEN, H. J. **The plasticity of plant genomes : Causes and consequences: a survey of data on structural genome variation in plants**. Bilthoven: Cogem, 2020. Disponível em: <<https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/575389>>. Acesso em: 7 jul. 2024.

MACKEH, R. et al. C2H2-Type Zinc Finger Proteins: Evolutionarily Old and New Partners of the Nuclear Hormone Receptors. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 15, p. 1550762918801071, 2018.

MCKINNEY, W. **Data Structures for Statistical Computing in Python**. . Em: PYTHON IN SCIENCE CONFERENCE. Austin, Texas: 2010. Disponível em: <<https://conference.scipy.org/proceedings/scipy2010/mckinney.html>>. Acesso em: 25 jun. 2024

MHIRI, C.; BORGES, F.; GRANDBASTIEN, M.-A. Specificities and Dynamics of Transposable Elements in Land Plants. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 488, 23 mar. 2022.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, jan. 2006.

MOUGA, D. M. D. DA S. et al. Pollinic characterization of *Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae), *Dyckia brevifolia* Baker and *Dyckia ibiramensis* Reitz (Bromeliaceae), reophyte and saxicolous endemic species of river Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brazil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 4, n. 1, p. 71–82, 29 jun. 2017.

MURAT, F.; PEER, Y. V. DE; SALSE, J. Decoding Plant and Animal Genome Plasticity from Differential Paleo-Evolutionary Patterns and Processes. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 9, p. 917–928, 1 jan. 2012.

OLIVEIRA DE OLIVEIRA, L. et al. Molecular markers in *Carya illinoensis* (Juglandaceae): from genetic characterization to molecular breeding. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 560–569, 3 set. 2021.

OROZCO-ARIAS, S.; ISAZA, G.; GUYOT, R. Retrotransposons in Plant Genomes: Structure, Identification, and Classification through Bioinformatics and Machine Learning. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3837, jan. 2019.

PANDE, A.; ARORA, S. Molecular Strategies for Development of Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Cell & Cellular Life Sciences Journal**, v. 2, 31 jul. 2017.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PETRY, V. S. et al. Repetitive genomic elements in *Campomanesia xanthocarpa*: prospection, characterization and cross amplification of molecular markers. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 423, 28 out. 2019.

PINANGÉ, D. S. B. et al. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 1, p. 39–56, 1 jan. 2017a.

PINANGÉ, D. S. B. et al. Molecular phylogenetics, historical biogeography and character evolution in *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 1, p. 39–56, 1 jan. 2017b.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.-M. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502–503, 1 jul. 1999.

RAUWERDINK, A.; KAZLAUSKAS, R. J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Fold Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 10, p. 6153–6176, 2 out. 2015.

REHMAN, S.; MAHMOOD, T. Functional role of DREB and ERF transcription factors: regulating stress-responsive network in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 9, p. 178, 8 ago. 2015.

RIBEIRO, T. et al. Diversity of repetitive sequences within compact genomes of *Phaseolus* L. beans and allied genera *Cajanus* L. and *Vigna* Savi. **Chromosome Research**, v. 28, n. 2, p. 139–153, 1 jun. 2020.

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, 1 maio 2017.

ROGALSKI, J. M. et al. Demographic structure of clonal, endemic, and endangered rheophyte bromeliad *Dyckia ibiramensis*: asexual vs sexual reproduction. **Rodriguésia**, v. 72, p. e00752020, 3 dez. 2021.

ROLLAND, N. et al. The Biosynthetic Capacities of the Plastids and Integration Between Cytoplasmic and Chloroplast Processes. **Annual Review of Genetics**, v. 46, n. 1, p. 233–264, 2012.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 248–249, 2008.

ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 1 dez. 2017.

SABLOK, G. et al. Chloroplast genomics: Expanding resources for an evolutionary conserved miniature molecule with enigmatic applications. **Current Plant Biology**, v. 7–8, p. 34–38, nov. 2016.



SAHEBI, M. et al. Contribution of transposable elements in the plant's genome. **Gene**, v. 665, p. 155–166, jul. 2018.

SANDOVAL-PADILLA, I. et al. Complete sequence of wild *Physalis philadelphica* chloroplast genome. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 3295–3297, 3 jul. 2019.

SARZI, D. S. et al. Discovery and characterization of SSR markers in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) using low coverage genome sequencing. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20180420, 8 abr. 2019.

SATO, N. Complex origins of chloroplast membranes with photosynthetic machineries: multiple transfers of genes from divergent organisms at different times or a single endosymbiotic event? **Journal of Plant Research**, v. 133, n. 1, p. 15–33, jan. 2020.

SATO, N. Are Cyanobacteria an Ancestor of Chloroplasts or Just One of the Gene Donors for Plants and Algae? **Genes**, v. 12, n. 6, p. 823, 27 maio 2021.

SAUGUET, L. The Extended “Two-Barrel” Polymerases Superfamily: Structure, Function and Evolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 20, p. 4167–4183, 20 set. 2019.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, fev. 2000.

SCHULTE, K. et al. Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 3, p. 1105–1119, 1 dez. 2010.

SCHÜTZ, N. et al. Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 323–342, 1 jul. 2016.

SHCHERBAN, A. B. Repetitive DNA sequences in plant genomes. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 5, n. 3, p. 159–167, 1 maio 2015.

SHEIKH-ASSADI, M. et al. Complete chloroplast genome of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss and its comparative analysis: lights into selective pressure and adaptive evolution. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9375, 7 jun. 2022.

SHEU, Y. et al. Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.

SOARES, L. E. et al. Genetic diversity and population structure of *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), a species from the Southern Brazilian Highlands. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 1 Suppl 1, p. 308–317, 2018.

SONG, Y. et al. Function of Chloroplasts in Plant Stress Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13464, jan. 2021.

SORK, V. L. Genomic Studies of Local Adaptation in Natural Plant Populations. **Journal of Heredity**, v. 109, n. 1, p. 3–15, 1 jan. 2018.

SRIVASTAVA, S. et al. Patterns of microsatellite distribution across eukaryotic genomes. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 153, dez. 2019.

STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl\_2, p. W465–W467, 1 jul. 2005.

STEFENON, V. M.; SARZI, D. S.; ROESCH, L. F. W. High-throughput sequencing analysis of *Eugenia uniflora*: insights into repetitive DNA, gene content and potential biotechnological applications. **3 Biotech**, v. 9, n. 5, p. 200, 3 maio 2019.

THE GALAXY COMMUNITY. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W345–W351, 5 jul. 2022.

TILLICH, M. et al. GeSeq – versatile and accurate annotation of organelle genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W6–W11, 3 jul. 2017.

TYAGI, S. et al. Codon Usage Provide Insights into the Adaptation of Rice Genes under Stress Condition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1098, jan. 2023.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115–e115, ago. 2012.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.

WAMBUGU, P. W.; NDJIONDJOP, M.-N.; HENRY, R. J. Role of genomics in promoting the utilization of plant genetic resources in genebanks. **Briefings in Functional Genomics**, v. 17, n. 3, p. 198–206, 1 maio 2018.

WANG, X.; WANG, L. GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 13 set. 2016.

WREGE, M. S. et al. **Atlas climático da Região Sul do Brasil - Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: [s.n.]. v. 1

XU, J.; WANG, N. Where are we going with genomics in plant pathogenic bacteria? **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 729–736, 1 jul. 2019.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781–803, 2006.

YANG, L.; LI, Q.; ZHAO, G. Characterization of the complete chloroplast genome of *Chenopodium* sp. (Caryophyllales: Chenopodiaceae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 4, n. 2, p. 2574–2575, 3 jul. 2019.

YAO, X. et al. Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China. **New Phytologist**, v. 176, n. 2, p. 472–480, 2007.

YEAMAN, S. et al. Conservation and divergence of gene expression plasticity following c. 140 million years of evolution in lodgepole pine (*Pinus contorta*) and interior spruce (*Picea glauca* × *Picea engelmannii*). **New Phytologist**, v. 203, n. 2, p. 578–591, 2014.

YOUNIS, A. et al. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1374, out. 2020.

ZANELLA, C. M. et al. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1020–1026, 2012.

ZHAN, J.; MEYERS, B. C. Plant Small RNAs: Their Biogenesis, Regulatory Roles, and Functions. **Annual Review of Plant Biology**, v. 74, n. Volume 74, 2023, p. 21–51, 22 maio 2023.

ZHANG, F. et al. The nature and genomic landscape of repetitive DNA classes in *Chrysanthemum nankingense* shows recent genomic changes. **Annals of Botany**, v. 131, n. 1, p. 215–228, 1 jan. 2023.

ZHANG, Y. et al. The Role of Chloroplast Gene Expression in Plant Responses to Environmental Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6082, jan. 2020.

ZIESCHANK, V.; MUOLA, A.; JUNKER, R. R. **Tolerance to land-use changes through natural modulations of the plant microbiome**. bioRxiv, , 13 nov. 2023. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.11.13.566857v1>>. Acesso em: 5 mar. 2024

ZIZKA, A. et al. Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). **Diversity and Distributions**, v. 26, n. 2, p. 183–195, 2020.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo proporcionou um avanço no entendimento genético e genômico de *Dyckia ibiramensis*. A partir do sequenciamento parcial do genoma nuclear e da montagem completa do plastoma, foi possível explorar aspectos da biologia molecular desta planta, oferecendo subsídios importantes para futuras estratégias de conservação e manejo. Os resultados deste trabalho confirmaram a complexidade genética de *D. ibiramensis*, destacada pela identificação de milhares de genes e pela presença de elementos repetitivos, como retrotransposons e microssatélites. Esses elementos têm um papel essencial na regulação do genoma e na adaptação da espécie a ambientes extremos, como as condições de alta luminosidade e baixa disponibilidade de água características de seu habitat natural. A prevalência de retroelementos LTR, em particular, sugere a existência de mecanismos genéticos robustos que permitem à espécie se ajustar a essas condições adversas. Além disso, o desenvolvimento e a validação de marcadores microssatélites específicos revelaram uma alta variabilidade genética entre as populações estudadas, fator fundamental para a sobrevivência e resiliência da espécie a longo prazo.

A análise do genoma também demonstrou a presença de regiões genéticas associadas à fotossíntese, metabolismo energético e resposta ao estresse ambiental, genes esses que são essenciais para a adaptação de *D. ibiramensis* ao seu ambiente específico. A montagem do plastoma, por sua vez, confirmou a estrutura genética conservada dos cloroplastos, ressaltando a importância da função fotossintética na sobrevivência da espécie.

Os dados genômicos gerados por este estudo demonstram a importância da conservação de *D. ibiramensis*, tanto do ponto de vista ecológico quanto biotecnológico. As informações e os novos marcadores moleculares desenvolvidos poderão ser aplicados em estudos futuros voltados para a genética da conservação, contribuindo para a formulação de estratégias de manejo eficazes e para a conservação das populações naturais dessa espécie. Embora a espécie esteja restrita a uma área geográfica limitada e seja considerada em risco de extinção, ela mantém um considerável potencial evolutivo que deve ser protegido.

Estudos futuros podem incluir uma maior cobertura do sequenciamento da espécie, bem como de espécies relacionadas, para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos evolutivos e adaptativos que influenciam essa espécie e seu ecossistema. Além disso, estudos voltados para a ecologia das populações de *D. ibiramensis* em diferentes micro-habitats podem fornecer informações relevantes sobre a plasticidade fenotípica e a resposta a pressões ambientais variadas ao qual está exposta. Por fim, este estudo se utilizou de estratégias adequadas para testar a informatividade dos marcadores, uma amostragem maior e um estudo

específico de diversidade e estrutura genética são necessários para obter conclusões mais detalhadas sobre o estado de conservação de *D. ibiramensis*.