

Isolamento, caracterização e
transferência de marcadores
microsatélites para *Vriesea carinata*
Wawra (Bromeliaceae)
desenvolvidos *in silico*.

Cristina Corrêa Todeschini

Porto Alegre, dezembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Isolamento, caracterização e
transferência de marcadores
microssatélites para *Vriesea carinata*
Wawra. (Bromeliaceae) desenvolvidos
in silico.

Aluno: Cristina Corrêa Todeschini

Orientadora: Fernanda Bered

Relatório apresentado à Comissão de Bacharelado do
Departamento de Genética para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em
Biologia Molecular, Celular e Funcional - UFRGS

2016/2

*"Você não está aqui somente para ganhar a vida.
Está aqui para fazer com que a vida seja mais ampla,
com uma visão maior, com um espírito grande de esperança e conquista,
você está aqui para enriquecer o mundo,
e se empobrece quando esquece disso"
- Woodrow Wilson*

Agradecimentos

Agradecer não é o suficiente, mas é a forma como tenho para expressar sua importância na minha vida, mesmo que seja durante anos ou minutos, cada instante foi essencial para que no decorrer da minha caminhada eu me encontrasse agora onde estou.

Agradeço a vocês meus amados, pai Fernando, mãe Maria Idelma e irmãos Fernando, Victor e Débora que durante toda minha existência sempre me apoiaram, me deram força quando eu achava obstáculos difíceis demais e sempre foram exemplos para mim. A toda minha família obrigada pelo amor incondicional.

Agradeço a ti, minha querida orientadora, professora Fernanda Bered, por toda sua dedicação, paciência, empenho e esforço para que eu me tornasse melhor como pessoa e como profissional. Muito obrigada por todas as oportunidades e por sua confiança em mim. Serei eternamente grata.

Agradeço a vocês professores, colegas e amigos do Núcleo de Genética e Conservação de Plantas da UFRGS sem os quais esse trabalho não existiria, obrigada pela ajuda, pela disposição, responsabilidade e trabalho em conjunto. Foi um prazer conviver com vocês, dividindo as angústias de quando os experimentos davam errados e as alegrias de quando tudo dava certo. Em especial agradeço a Camila Zanella, Camila Aguiar, Laís Mara, Márcia Goetze e Luíza Hirsch pela amizade e por dias de trabalho mais sorridentes e divertidos.

Agradeço a Frank Guzman, que ajudou com a construção da biblioteca de RNA de *V.carinata* através de NGS e ao José Luiz Parizotto, que ajudou na análise preliminar e desenho dos *primers*.

A vocês meus queridos amigos o meu muito obrigada por me darem força, me incentivar e acreditar em mim. Por nas horas tristes e felizes estarem ao meu lado, por compreenderem minha ausência e estarem sempre de braços abertos para me receber. Por todas as conversas e esparecimento nos finais de semana.

Agradeço a Capes, Fapeg e CNPq pelo suporte financeiro fundamental na execução deste trabalho.

Muito obrigada a todos por mais uma etapa da minha vida ser concluída, cada um teve sua participação no meu crescimento.

“A felicidade só é real quando compartilhada.” - H. David Thoreau

*“A mutação é parte intrínseca da vida.
Sem mutação, não pode haver variabilidade genética,
pois a mutação é a origem de toda variabilidade.
Sem variabilidade não poderia haver seleção.
Sem seleção não há evolução.
Sem evolução não há adaptação.”*

- Bernardo Erdtmann

SUMÁRIO

ABSTRACT	8
Capítulo 1.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Família Bromeliaceae	10
1.2. O Gênero <i>Vriesea</i> e a espécie <i>Vriesea carinata</i> (Wawra)	12
1.3. Marcadores moleculares do tipo microssatélites.....	13
1.4. Genética da Conservação.....	19
1.5. Objetivos	21
Capítulo 2.....	22
ARTIGO.....	23
RESUMO	24
1. Introdução	26
2. Materiais e Métodos	28
2.1. Coleta das amostras e extração de DNA.....	28
2.2. Construção da biblioteca enriquecida de microssatélite e desenho de <i>primers</i>	28
2.3. Condições de amplificação e genotipagem	29
2.4. Análises dos dados	29
2.5. Amplificação heteróloga	30
3. Resultados	31
3.1. Identificação dos microssatélites e desenho de <i>primers</i>	31
3.2. Polimorfismo dos microssatélites em <i>V. carinata</i>	38
3.3. Análise de diversidade genética.....	41
3.4. Amplificação heteróloga	42
4. Discussão	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
Capítulo 3.....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	58

ABSTRACT

Bromeliads are typical plants of the New World and have been widely used for various purposes such as ornamentation, fibers, fodder, food, medicinal, among others. *Vriesea* is the second largest genus of the subfamily Tillandsioideae, being composed of native species from South America, mainly from Brazil, covering the South and Southeast regions of the country. They are mainly epiphytic plants, and have aerial roots exposed to the humid atmosphere. *Vriesea carinata* is a small species, has a red inflorescence with yellow border of bracts and also yellow flowers, being quite attractive for hummingbirds and much sought after for ornamentation of baskets and floral arrangements. In the present study, thirty microsatellite markers were developed and characterized from an RNA enriched library of *V. carinata*. Of these, seventeen microsatellite loci had satisfactory amplification, of which thirteen were polymorphic and tested in three natural populations of *V. carinata*. The results indicated a relatively high expected heterozygosity ($H_E = 0.682$), but there is a heterozygote deficit compared to the heterozygosity values obtained ($H_O = 0.456$). The allelic richness ranged from 2,395 to 2,722 and the number of alleles ranged from four to 15 with an average of 7.23 alleles per locus. Heterologous amplification was performed in 15 species of three subfamilies of Bromeliaceae. Of the 13 developed loci, four amplified in more than 50% of the species, suggesting its potential usefulness in studies on population genetics involving other bromeliad's species. All microsatellite markers developed here may be used in future studies to evaluate genetic diversity and may propose effective conservation strategies based on the results obtained.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae compreende aproximadamente 3.510 espécies distribuídas em 59 gêneros (Gouda, 2016), e está entre as famílias de maior riqueza e diversidade da Mata Atlântica (Martinelli *et al.*, 2008). Podem ser encontradas em praticamente todos os ecossistemas neotropicais, desde o nível do mar, em praias, mangues e restingas, até altitudes de 5.000m, nos Andes, com distribuição geográfica restrita basicamente às Américas (exceção feita somente à uma espécie do gênero *Pitcairnia*, originária da África) (Smith & Downs, 1974). A família se caracteriza por apresentar uma alta radiação adaptativa, devido aos diversos processos de especiação que ocorreram em curto período de tempo, a partir de uma mesma espécie ancestral, ocupando, essas novas espécies, simultaneamente, vários nichos ecológicos livres (Benzing, 2000; Aoki-Gonçalves *et al.*, 2014). Sendo assim, as bromélias podem ser terrestres, epifíticas ou rupícolas (Benzing, 2000), geralmente herbáceas, variando de plantas delicadas e de pequeno porte, como *Tillandsia recurvata* (L.) L., com alguns centímetros de comprimento, até plantas de grande porte, como *Puya raimondii* Harms, encontrada nos Andes, que chega a atingir mais de 10 metros de altura (Smith & Downs, 1974; Reitz, 1983).

No Brasil podemos encontrar cerca de 50% das espécies conhecidas, sendo um importante centro de diversidade da família. O País possui vários gêneros endêmicos, alguns deles encontrados exclusivamente na Floresta Atlântica (Martinelli, 1994). As bromélias são ervas perenes que combinam uma grande variação de formas, cores e tamanhos. Segundo Rizzini (1997) e Benzing (2000) os diferentes habitats e, especialmente, a natureza do substrato influenciam no aspecto da planta, que pode variar amplamente em tamanho e coloração das folhas, assim como na morfologia das flores. As bromélias possuem folhas dispostas em roseta, que possibilitam o acúmulo de água, ou folhas carnosas que funcionam como órgãos de reserva. Os tricomas foliares possibilitam a absorção de água e o desenvolvimento de várias estratégias para lidar com o estresse hídrico, permitindo uma extraordinária versatilidade ecológica (Benzing, 2000).

Apesar da crescente demanda na utilização de bromélias como plantas ornamentais, tanto no Brasil quanto no exterior, são poucos os produtores nacionais efetivos que atendem ao mercado consumidor, havendo, portanto, uma procura maior do que a oferta. No Brasil, os gêneros mais conhecidos e empregados em paisagismo são representados por *Alcantarea* e algumas espécies de *Aechmea*, *Neoregelia* e *Cryptanthus*; nos jardins internos e vasos, estão mais presentes os gêneros *Nidularium*, *Vriesea*, *Guzmania*, *Tillandsia*, *Billbergia*, e algumas espécies de *Aechmea* e *Neoregelia*. Sendo assim, surge uma lacuna que é preenchida com o comércio ilegal de bromélias provenientes do extrativismo. Além disso, grande parte das espécies ocorre na Mata Atlântica, um dos biomas com maiores índices de destruição do planeta. Por estes dois motivos, as populações de bromélias, de maneira geral, vêm sendo destruídas e ameaçadas, estando várias espécies presentes na lista vermelha publicada pelo IUCN (The World Conservation Union) e na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção do Ministério de Meio Ambiente.

A importância econômica das bromélias é também destacada pelo cultivo do abacaxi, *Ananas comosus* (L.) Merrill, muito apreciado na alimentação, como produtora de bebidas, doces e sobremesas. Outra espécie de grande valor econômico é o “caroá-verdadeiro”, *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, utilizada como produtora de fibras. Na medicina natural, como digestiva, depurativa e com outras funções, tem-se o uso da enzima bromelina, presente em muitas espécies de bromélias (Gregory, 1996). O tratamento taxonômico mais abrangente para a família foi realizado por Smith & Downs (1974, 1977, 1979), que apresentaram a monografia das tradicionais três subfamílias em três volumes como parte da monografia de Bromeliaceae para a Flora Neotrópica. Nesta obra foram referidas cerca de 2.000 espécies, número bastante ampliado em função dos trabalhos posteriores e das novas espécies descritas, atingindo no momento mais de 3.350 espécies para a família. Outros trabalhos podem ser citados como o de Reitz (1983) que realizou o estudo das bromeliáceas do Estado de Santa Catarina, com a apresentação de 100 espécies incluídas em 15 gêneros. Atualmente, os estudos florísticos que envolvem a família, como revisões genéricas, vêm ampliando consideravelmente na última década o conhecimento desta importante família neotropical.

As três subfamílias descritas por Smith & Downs (1974, 1977, 1979), Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, foram divididas em um estudo recente baseado em oito regiões plastidiais que demonstrou que Pitcairnioideae é parafilética, separando-a em seis subfamílias e propondo o seguinte relacionamento entre elas: (Brocchinioideae, (Lindmanioideae, (Tillandsioideae, (Hechtioideae, (Navioideae, (Pitcairnioideae, (Puyoideae, Bromelioideae)))); (Givnish *et al.*, 2007, 2011).

1.2. O Gênero *Vriesea* e a espécie *Vriesea carinata* (Wawra)

O gênero *Vriesea* pertence à subfamília Tillandsioideae. Seu nome foi dado em homenagem ao médico e botânico holandês Willem Hendrik de Vriese (1806-1862). *Vriesea* é o segundo maior gênero da subfamília, sendo composto de aproximadamente 280 espécies nativas da América do Sul, principalmente do Brasil (Costa *et al.*, 2015), estando distribuídas da Região Sul à Região Sudeste do país, Rio Grande do Sul ao Espírito Santo (Figura 1). São plantas preferencialmente epífitas, ou seja, crescem suportadas por outra planta e tem as raízes aéreas expostas à atmosfera úmida. Estas plantas tropicais abrigam uma grande variedade de insetos. Muitas espécies desse gênero são cultivadas como plantas ornamentais.



Figura 1: Mapa do Brasil com distribuição geográfica de *Vriesea carinata*.

Vriesea carinata Wawra. é uma espécie de pequeno porte, possui inflorescência vermelha com a borda das brácteas amarelas e flores também amarelas (Fig. 2), sendo



Figura 2: *Vriesea carinata* em seu ambiente natural. Fonte: Botanical Gardens Berlin-Dahlem

bastante atrativa para beija-flores e muito procurada para ornamentação de cestas e arranjos florais. Seu hábitat consiste em locais bastante úmidos e sombreados dentro da mata. Elas ainda podem formar touceiras grandes, dando um aspecto muito bonito ao conjunto. Seus frutos são secos e deiscentes, liberando as sementes plumosas ao vento (Costa & Wendt, 2007).

1.3. Marcadores moleculares do tipo microsatélites

Os marcadores microsatélites ou SSR (“simple sequence repeats”) possuem características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações, hibridação e evolução, assim como genética da conservação (Powel *et al.*, 1996). Estas sequências são constituídas de DNA repetitivo, dispostas lado a lado, onde pequenos motivos (um a seis pares de base) são repetidos n vezes e classificadas de acordo com seu tamanho, o tipo de unidade de repetição e a sua localização no genoma. Os microsatélites representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais, geralmente adições ou deleções, de um número integral de repetições, com taxa muito mais elevada do que taxas observadas em sequências de DNA não repetitivo (Jarne & Lagoda, 1996), estando esta alta taxa de mutação relacionada com a evolução do microsatélite, ou seja, qualquer mudança na região repetitiva resultando no aumento ou diminuição no número de repetições (Ellegren, 2004). Estão distribuídos ao longo de sequências codificantes e não codificantes do DNA (Schlötterer & Tautz, 1992). Estas regiões repetitivas têm sido identificadas nos genomas de eucariotos nos três genomas: núcleo e cloroplasto (Powell *et al.*, 1996) e mitocôndria (Soranzo *et al.*, 1999) e também de procariotos. A distribuição e a frequência de regiões microsatélites variam entre diferentes classes de organismos. Os microsatélites são distribuídos de

forma não aleatória ao longo de genomas eucarióticos, e mostra diferentes propriedades em regiões genômicas de funcionalidade diferente (Bernardes, 2014). Além disso, fornecem um número de vantagens sobre os outros marcadores moleculares: (i) pequenas quantidades de DNA são necessárias, (ii) vários alelos microssatélites podem ser detectados em um único loco a partir de uma simples PCR (Reação da Polimerase em cadeia), (iii) a análise de detecção do alelo é passível de automatização e dimensionamento (Schlötterer, 2000, Duran *et al.*, 2009).

A gênese dos microssatélites pode ser explicada por duas hipóteses, a primeira sugere que as regiões microssatélites podem surgir espontaneamente a partir de ou dentro de sequências únicas (*de novo* microssatélites) e a segunda hipótese propõe que os microssatélites são trazidos em forma primordial de uma localização genômica receptiva por transposons (*adopted* microssatélites) (Buschiazzo & Gemmell, 2006).

Regiões contendo sequências simples repetidas são amplificadas individualmente através de PCR utilizando-se um par de “*primers*” específicos (de 20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Segmentos amplificados a partir desses sítios quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo, resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada “ilha” microssatélite, independentemente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.), constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de bases) representa um alelo diferente do mesmo loco. A detecção de sequências de microssatélites via PCR pode ser feita em gel de eletroforese, utilizando-se poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução, uma vez que é necessário um gel adequado para separação de segmentos que diferem por poucos pares de bases, dependendo do número de nucleotídeos do elemento repetido no microssatélite. Mais recentemente, a genotipagem de locos de microssatélites tem sido realizada em sequenciador automático por eletroforese capilar. Cada loco de microssatélites é analisado individualmente ao se analisar o par de “*primers*”, constituído especialmente para sua amplificação. Mais do que um loco pode ser analisado de cada vez, quando os alelos de cada loco têm tamanhos suficientemente diferentes e migram para zonas

separadas no gel. Nesses métodos de genotipagem, denominados “multiplex”, mais do que um par de “*primers*” específicos são utilizados simultaneamente, na mesma reação de PCR. Locos de microssatélites parecem ser somaticamente estáveis, possuem expressão codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados e são altamente multialélicos, numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados (Tran *et al.*, 1997).

Tendo em vista sua herança codominante e o multialelismo, os marcadores microssatélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Além disso, os microssatélites são muito frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo uma completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. A observação de que ocorre conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas, torna possível, em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies ou mesmo gênero, usando-se *primers* heterólogos (Schlotterer, 2003; Barbará *et al.*, 2007).

Como mencionado anteriormente, uma vez desenvolvidos, estes marcadores são potencialmente transferíveis para espécies filogeneticamente próximas, devido à natureza homóloga da sequência de DNA nas regiões que delimitam os microssatélites. Sendo assim, como essas regiões são altamente conservadas entre táxons, isso possibilita a amplificação cruzada entre espécies relacionadas, ou seja, a amplificação heteróloga dos locos e, portanto, a transferibilidade entre espécies (Varshney *et al.*, 2005; Barbará *et al.*, 2007). A taxa de amplificação bem-sucedida diminui à medida que a divergência genética entre as espécies aumenta (Primmer & Merilä, 2002). A transferibilidade pode reduzir os custos quando o grupo de pesquisa trabalha com um conjunto de espécies relacionadas.

A estratégia de desenvolvimento de marcadores microssatélites mais tradicional consiste na construção de uma biblioteca genômica da espécie de interesse, hibridização com sondas contendo repetições simples, sequenciamento dos clones positivos e desenho dos pares de primers que delimitam a região microssatélite (Rassmann *et al.* 1991; Caixeta *et al.*, 2006). Em termos de tempo e esforço esta estratégia apresenta um desafio técnico considerável e esta abordagem pode vir a ser

extremamente ineficiente para espécies com baixa frequência de microssatélites (Bernardes, 2014). Nessa técnica, o DNA genômico de uma espécie deve ser clivado por uma enzima de restrição, visando obter fragmentos de DNA que supostamente terão as sequências de microssatélites com um determinado tamanho (Figura 3). Após a digestão, com o objetivo de garantir que todos os fragmentos tenham uma terminação comum e conhecida, estes fragmentos podem ser ligados a oligonucleotídeos adaptadores. Os fragmentos contendo as sequências de DNA microssatélites são enriquecidos e selecionados através de hibridização com uma sonda. Aqueles ricos em repetições são inseridos em um vetor de clonagem. Esse vetor é utilizado para transformar, através de transformação química, bactérias *Escherichia coli*, visando selecionar apenas os clones positivos (Oliveira *et al.*, 2011). Para isso, prepara-se o vetor que vai incorporar o seu fragmento de DNA. O plasmídeo deve ser clivado com a mesma enzima utilizada na digestão do DNA. Há uma ligação entre o fragmento de DNA e o plasmídeo (DNA ligase). Assim, os plasmídeos recombinantes são inseridos em células de bactérias e as mesmas são colocadas em condições adequadas para que haja proliferação. É feita uma triagem das colônias utilizando sondas de microssatélites e os clones positivos são purificados e sequenciados. Após a confirmação da presença de microssatélites, estes deverão ser validados.

Além da técnica descrita acima, diversos protocolos alternativos foram desenvolvidos para reduzir o tempo investido e aumentar significativamente o rendimento do isolamento de locos de microssatélites (Zane *et al.*, 2002). Atualmente, com a utilização do sequenciamento de nova geração (NGS), uma quantidade enorme de dados tem sido gerada em curto espaço de tempo e baixo custo. A localização e o desenho dos *primers* que delimitam os SSR são realizados por meio de programas computacionais que identificam sequências SSR. Com a construção de bibliotecas de sequências (codificadoras ou não) a possibilidade de isolar os microssatélites *in silico* se tornou uma realidade atrativa e viável, evitando o trabalho de laboratório. O nosso grupo de pesquisa construiu uma biblioteca de RNA de *V. carinata*, a qual foi sequenciada por NGS (Guzman *et al.*, 2013). Os resultados gerados se tornaram uma excelente oportunidade para o isolamento de marcadores microssatélites desta espécie. Resumidamente, a técnica consta de (i) obtenção das sequências do genoma de

interesse (ii) identificação de regiões microssatélites únicas nas sequências obtidas; (iii) desenho de pares de *primers* específicos em regiões adequadas; (iv) otimização do protocolo de PCR para a obtenção de produtos referentes a cada loco microssatélite; (v) análise dos padrões das bandas e dos produtos de PCR com relação ao polimorfismo para validação das regiões microssatélites como marcadores moleculares (Roder *et al.*, 1998; Semagn *et al.*, 2006).

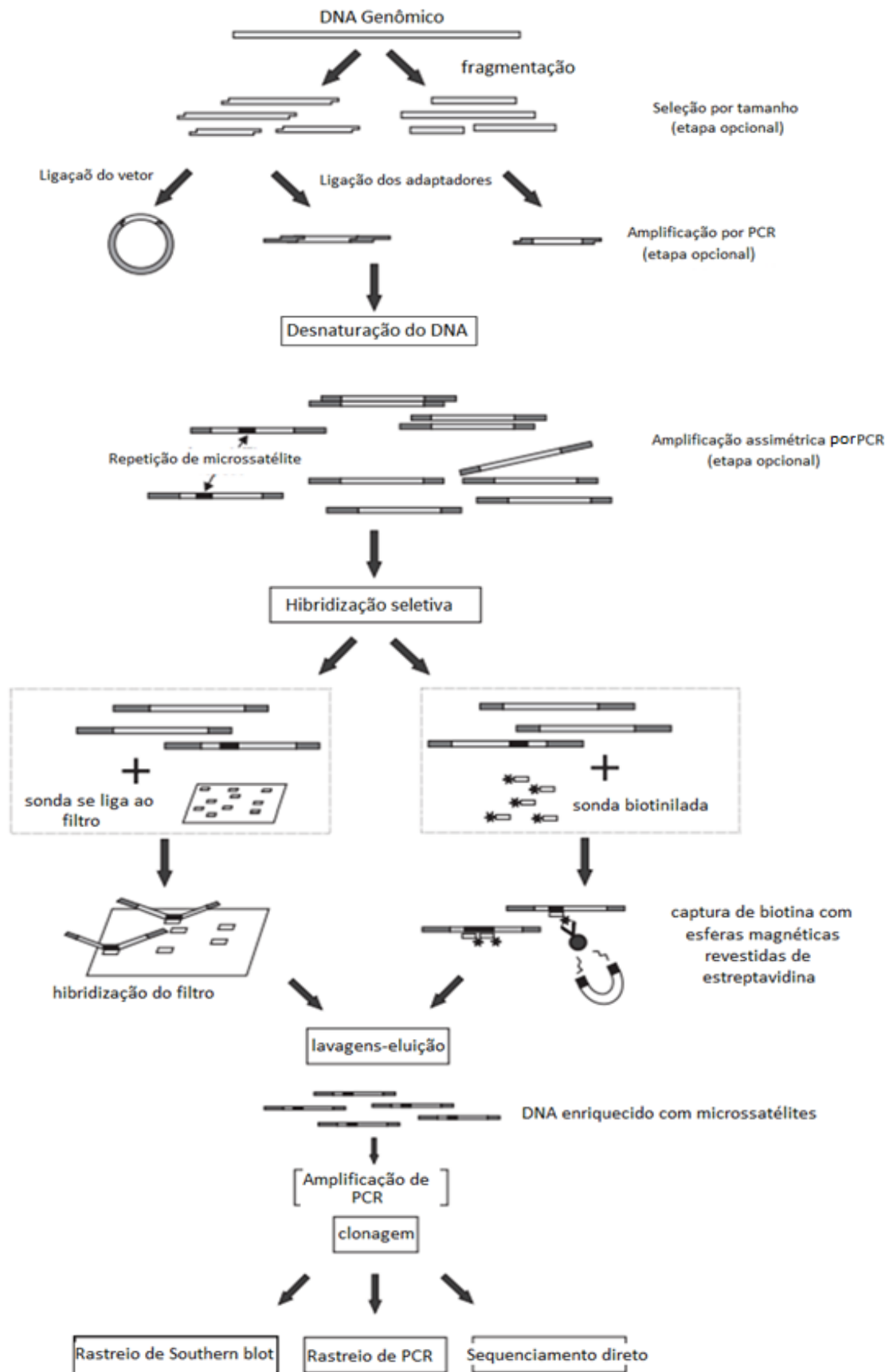


Figura 3: Representação esquemática dos protocolos de bibliotecas enriquecidas de microssatélites. Adaptado de Zane *et al.*, 2002.

Bibliotecas de microssatélites na família Bromeliaceae já foram desenvolvidas e caracterizadas para as principais subfamílias, por exemplo, Tillandsioideae (Boneh *et al.*, 2003; Palma-Silva *et al.*, 2007), Pitcairnoideae (Sarhou *et al.*, 2003; Paggi *et al.*, 2008; Hmeljevski *et al.*, 2013) e mais recentemente para Bromelioideae (Wörhmann & Weising, 2011; Zanella *et al.*, 2012; Goetze *et al.*, 2013; Aoki-Gonçalves *et al.*, 2014). Todos esses estudos foram desenvolvidos através de métodos semelhantes baseados em bibliotecas de DNA enriquecidas com microssatélites.

Os marcadores moleculares, em particular os microssatélites, têm sido utilizados em investigações genéticas com diversas finalidades, como por exemplo, na identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, determinação de paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos. A utilidade destes marcadores, aliados aos avanços na biotecnologia, possibilita perspectivas promissoras na pesquisa básica e aplicada. No melhoramento animal e vegetal, por exemplo, devido à elevação da intensidade e precisão da seleção e da diminuição do intervalo entre gerações, esses marcadores têm sido de grande importância. Outras aplicações como determinação do grau de estruturação de populações, a frequência de fenômenos migratórios, o afunilamento demográfico, a redução do tamanho efetivo de uma população e as aplicações forenses, como por exemplo o rastreio de abates ilegais, também têm sido muito utilizadas (Caminhas *et al.*, 1992).

1.4. Genética da Conservação

A proteção da vida não é apenas uma premissa ética, mas uma necessidade econômica. A dependência humana em relação à diversidade de plantas, animais e microorganismos pode ser facilmente reconhecida pela variedade de alimentos, medicamentos, além da estabilidade climática e ambiental, sem a qual há alterações no comportamento das plantas, principalmente relacionado à fenologia, levando a sua extinção e, com isso, consequências negativas para a sustentabilidade dos ecossistemas, dos quais todos nós dependemos. O Brasil é o país que detém os maiores níveis de biodiversidade no mundo, oferecendo uma vantagem competitiva inigualável para o seu

desenvolvimento econômico. Entretanto, o uso adequado dessa riqueza implica na sua conservação atual e para as futuras gerações (Pinto *et al.*, 1996).

Fatores relacionados à ação humana frequentemente reduzem as populações a tamanhos nos quais as espécies ficam susceptíveis a efeitos acidentais ou estocásticos (Frankham *et al.*, 2008), onde populações pequenas são ainda mais afetadas. A perda da diversidade genética, causada por esses fatores, reduz a habilidade das populações de adaptarem-se às mudanças ambientais via seleção natural.

A genética da conservação tem sido aplicada aos mais diferentes tópicos relacionados ao estudo e a conservação das espécies animais e vegetais em todo o planeta. No Brasil, a situação não é diferente. No decorrer dos últimos anos, um número crescente de trabalhos desenvolvidos por pesquisadores brasileiros vem sendo publicados em periódicos nacionais e internacionais. Esse fato evidencia a inserção desse tema na pauta de prioridades da nossa comunidade científica, o que contribui para o conhecimento e a conservação da biodiversidade brasileira e demonstra a capacidade relativa à aplicação de ferramentas modernas para o estudo e gerenciamento de nossos recursos naturais (Galetti *et al.* 2008).

Genética da conservação é o uso da teoria e técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas. Seu objetivo é preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais, através da elucidação de aspectos da biologia das espécies, relevantes para seu manejo e conservação. Análises moleculares também podem fornecer informações adicionais a respeito da distribuição histórica das espécies, expandindo as possibilidades para ações conservacionistas (Frankham *et al.*, 2008). Nesse contexto, os marcadores moleculares, em especial os microssatélites, podem ser extremamente úteis no diagnóstico dos níveis de diversidade genética nas populações, bem como o grau de estruturação das mesmas. De posse de um diagnóstico, recomendações podem ser realizadas de forma precisa no sentido da conservação de diferentes espécies.

1.5. Objetivos

O objetivo do presente trabalho é desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites para a espécie *Vriesea carinata* utilizando uma biblioteca de RNA gerada por NGS e examinar a transferabilidade desses locos em outras espécies de Bromeliaceae. Para isso, foram isoladas as sequências de microssatélites *in silico* a partir dos dados gerados por NGS; desenhados os *primers* para a amplificação dessas regiões; testados e validados os *primers* desenvolvidos em diferentes plantas de *Vriesea carinata* e testada a transferência dos locos desenvolvidos em 15 espécies relacionadas. Os resultados obtidos serão úteis para estudos de evolução e genética da conservação em *V. carinata* e outras espécies de bromélias.

Capítulo 2

ARTIGO

Isolamento, caracterização e transferência de marcadores microssatélites para *Vriesea carinata* (Bromeliaceae) desenvolvidos *in silico*.

Artigo a ser traduzido para o inglês e submetido a revista *Applied Plant Science Journal* da *Botanical Society American*.

Isolamento, caracterização e transferência de marcadores microssatélites para *Vriesea carinata* (Bromeliaceae) desenvolvidos *in silico*

CRISTINA C. TODESCHNI¹, JOSÉ L. B. PARIZOTTO¹, CAMILA M. ZANELLA¹, FRANK GUZMAN^{1,2}, ROGÉRIO MARGIS^{1,2}, MÁRCIA GOETZE¹, FERNANDA BERED^{1*}

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, CP 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Centro de Biotecnologia e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil

*E-mail para correspondência: fernanda.bered@ufrgs.br

RESUMO

As bromélias são plantas típicas do Novo Mundo e vêm sendo amplamente utilizadas para diversos fins, como ornamentação, fibras, forragem, alimentação, medicinal entre outros. *Vriesea* é o segundo maior gênero da subfamília Tillandsioideae, sendo composto de espécies nativas da América do Sul, principalmente do Brasil, abrangendo as regiões Sul e Sudeste do país. São plantas preferencialmente epífitas, e têm as raízes aéreas expostas à atmosfera úmida. *Vriesea carinata* é uma espécie de pequeno porte, possui inflorescência vermelha com a borda das brácteas amarelas e flores também amarelas, sendo bastante atrativa para beija-flores e muito procurada para ornamentação de cestas e arranjos florais. No presente estudo foram desenvolvidos e caracterizados trinta marcadores de microssatélites a partir de uma biblioteca enriquecida de RNA de *V. carinata*. Deste, dezessete locos de microssatélite tiveram amplificação satisfatória, dos quais treze foram polimórficos e testados em três populações naturais de *V. carinata*. Os resultados indicaram uma heterozigosidade esperada relativamente alta ($H_E = 0,682$), porém há um déficit de heterozigotos em comparação com os valores de heterozigosidade obtidos ($H_O = 0,456$). A riqueza alélica variou de 2,395 a 2,722 e número de alelos variou de quatro a 15 com uma média de 7,23 alelos por loco. A amplificação heteróloga foi realizada em 15 espécies de três subfamílias de Bromeliaceae. Dos 13 locos desenvolvidos, quatro amplificaram em mais

de 50% das espécies, sugerindo sua potencial utilidade em estudos de genética de populações envolvendo outras espécies de bromélias. Todos os marcadores de microssatélites aqui desenvolvidos poderão ser empregados em futuros estudos com a finalidade de avaliar a diversidade genética e poderão propor estratégias de conservação eficazes baseados nos resultados obtidos.

1. Introdução

As espécies de Bromeliaceae são exclusivas das áreas tropicais e subtropicais das Américas (exceto por uma espécie africana), sendo essa família caracterizada como um exemplo de radiação adaptativa (Aoki-Gonçalves *et al.*, 2014). Ao longo da sua evolução, as espécies adquiriram interessantes e diferentes mecanismos adaptativos, tais como tanques centrais, rota fotossintética CAM, e tricomas absorventes, características que lhes permitiu ocupar uma vasta gama de habitats (Benzing, 2000; Ranker *et al.*, 1990). Portanto, espécies desta típica família neotropical evoluíram para preencher uma variedade de nichos em habitats muito heterogêneos, com uma incrível diversidade de adaptações (Benzing, 2000). Tais processos rápidos de adaptação e especiação podem ser usados como modelos para estudar e compreender questões mais amplas sobre a evolução de plantas, como por exemplo coesão de espécies e isolamento reprodutivo (Barbará *et al.*, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2011).

No Brasil, a Mata Atlântica é considerada um dos principais centros de diversidade e endemismo de Bromeliaceae, abrigando 31 gêneros e 803 espécies, das quais 10 gêneros e 653 espécies são endêmicos (Porembski *et al.*, 1998). *Vriesea carinata* é uma espécie de pequeno porte, epífita ou terrestre, distribuída ao longo da Mata Atlântica. Possui inflorescência vermelha com a borda das brácteas amarelas e flores também amarelas, sendo bastante atrativa para beija-flores e muito procurada para ornamentação de cestas e arranjos florais. Seu hábitat consiste em locais bastante úmidos e sombreados dentro da mata, podendo formar touceiras grandes, o que pode ser bastante atrativo para ornamentação. Seus frutos são secos e deiscentes, liberando as sementes plumosas ao vento.

Microsatélites ou “simple sequences repeats” (SSRs) são os principais e mais eficientes marcadores usados em genética de populações devido ao seu alto grau de polimorfismo, facilidade de genotipagem, e herança codominante (Li *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006). Tradicionalmente, os microsatélites têm sido isolados utilizando métodos que envolvem bibliotecas enriquecidas (Zane *et al.*, 2002), entretanto com a crescente utilização de plataformas de sequenciamento de alto rendimento, ou sequenciamento de nova geração (NGS), a descoberta de um grande número de

marcadores microssatélites em um curto espaço de tempo se tornou possível e vem sendo realizada com mais frequência (Suresh *et al.*, 2013).

O objetivo do presente trabalho é desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites para a espécie *Vriesea carinata* utilizando uma biblioteca de RNA gerada por NGS e examinar a transferabilidade desses locos em outras espécies de Bromeliaceae. Para isso, foram isoladas as sequências de microssatélites *in silico* a partir dos dados gerados por NGS; desenhados os *primers* para a amplificação dessas regiões; testados e validados os *primers* desenvolvidos em diferentes plantas de *Vriesea carinata* e testada a transferência dos locos desenvolvidos em 15 espécies relacionadas. Os resultados obtidos serão úteis para estudos de evolução e genética da conservação em *V. carinata* e outras espécies de bromélias.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta das amostras e extração de DNA

Foram coletadas folhas frescas de 48 indivíduos de três populações naturais de *V. carinata* localizadas na região Sudeste do Brasil (Figura 4, Tabela 1), e foram armazenadas em sacos plásticos com sílica gel. O DNA genômico total foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990).

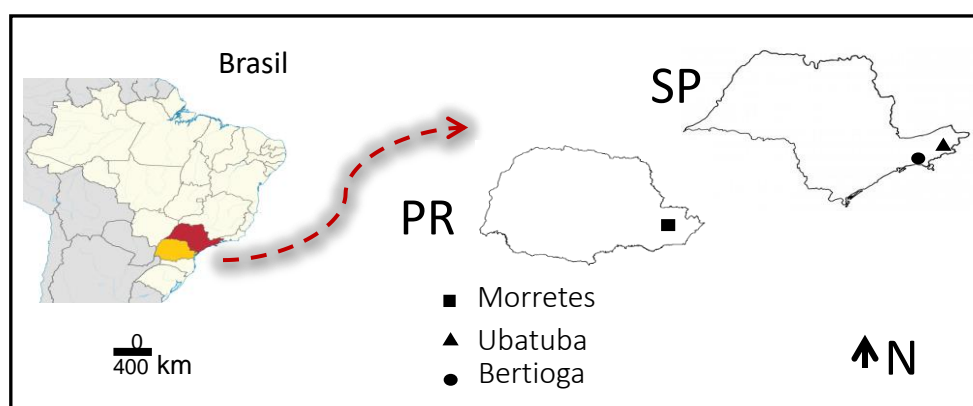


Figura 4: Populações amostradas dentro da distribuição geográfica de *V. carinata*.

Tabela 1: Localização das populações amostradas e diversidade genética em *Vriesea carinata*, incluindo o número de indivíduos amostrados (N), riqueza alélica (RS), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E); e o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) (* $P < 0,05$).

População	Latitude S	Longitude O	N	RS	H_O	H_E	F_{IS}
Bertiooga – SP	23° 51' 14"	46° 08' 20"	11	2,395	0,380	0,666	0,480*
Ubatuba – SP	23° 26' 02"	45° 04' 15"	13	2,722	0,547	0,729	0,267*
Morretes - PR	25° 28' 37"	48° 50' 02"	24	2,676	0,472	0,704	0,342*

2.2. Construção da biblioteca enriquecida de microssatélite e desenho de *primers*

No trabalho de Guzman *et al.* (2013) o RNA de *Vriesea carinata* foi isolado a partir de folhas. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a quantificação foi feita por Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) e após foi construída e sequenciada uma biblioteca de pequenos RNAs (sRNA) usando a plataforma Illumina HiSeq2000. A partir dessa biblioteca, foi realizada uma análise preliminar da presença de microssatélites e a determinação das funções de cada fragmento com o auxílio da ferramenta blas2go, o que gerou um rascunho de

sequências potenciais para o isolamento de microssatélites. As sequências preliminares foram analisadas e os *primers* que delimitam as regiões de microssatélites foram desenhados utilizando o programa Primer3.

2.3. Condições de amplificação e genotipagem

Para a validação dos locos de microssatélites foram realizadas, inicialmente, reações da polimerase em cadeia (PCR) em seis indivíduos de *V. carinata* contendo: 10ng de DNA genômico, 1x do tampão da enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 10pM de cada primer (“Foward” e “Reverse”), e 0,5 unidade de Taq polimerase (GoTaq, Promega), com um volume final de 10µl. O protocolo das amplificações foi realizado segundo Palma-Silva *et al.* (2007) através de programa do tipo “touchdown”, com exceção do locus 31, onde foi realizada uma reação de PCR comum, com desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto das amplificações foi separado por eletroforese em gel de agarose 2,0% e corado com GelRed. As amplificações foram comparadas com marcador de peso molecular de 100pb (LGC Biotecnologia).

Posteriormente, os locos que apresentaram amplificação satisfatória no gel de agarose tiveram seus PCRs repetidos, adicionando-se um terceiro primer a reação (M13; Schuelke, 2000), marcado com diferentes fluorescências (FAM, VIC, NED e PET). A reação de PCR foi realizada segundo Palma-Silva *et al.* (2007), com a exceção descrita anteriormente. O produto da amplificação foi genotipado em sequenciador automático (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em comparação com marcador de tamanho molecular *GS500 LIZ* e a identificação dos alelos foi realizada no programa GENEMARKER versão Demo 1.97 (*SoftGenetics*, State College, PA, USA). Os locos com perfeita amplificação e polimorfismo foram selecionados para análise da diversidade genética de três populações de *V. carinata*.

2.4. Análises dos dados

Para descrever a variação dos microssatélites, o número de alelos (A), as heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), e o conteúdo informativo de

polimorfismo (PIC) foram calculados. Para as heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) por população e por locos foi utilizado o programa MSA (Dieringer and Schlötterer, 2003) e para o número de alelos (A) foi usado o programa FSTAT (Goudet, 1995). Para o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) foi usado o CERVUS version 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007), sendo que o GENEPOP ON THE Web (Raymond and Rousset, 1995) foi usado para testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) dos locos.

Para medir a diversidade genética de *V. carinata*, a riqueza alélica (R_s) foi estimada para as três populações, utilizando-se o FSTAT, assim como o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}). Também foi testado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada população, conforme descrito acima.

2.5. Amplificação heteróloga

Todos os marcadores polimórficos foram testados quanto a sua transferabilidade em 15 espécies pertencentes a três subfamílias de Bromeliaceae: Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae. As condições das amplificações de PCR foram as mesmas descritas anteriormente. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% e corados com GelRed e comparadas com marcador de peso molecular de 500pb (LGC Biotecnologia). Os locos foram considerados como tendo amplificação satisfatória quando pelo menos uma banda do tamanho esperado foi visualizada.

3. Resultados

3.1. Identificação dos microssatélites e desenho de *primers*

Um total de 632 *contigs* foram selecionados previamente por apresentarem motivos de microssatélites, destes, 222 sequências analisadas continham regiões de microssatélites segundo os parâmetros utilizados. Um exemplo da saída dos dados pode ser visualizado na Tabela 2. A partir da seleção de sequências contendo microssatélites, 98 pares de *primers* foram desenhados. Destes 98 locos foram selecionados os 30 considerados mais promissores (Tabela 3), e após foi realizada a síntese dos *primers* e os testes em laboratório.

Tabela 2. Exemplo de sequências contendo os microssatélites em *Vriesea carinata*. ID: identificação do loco; Anotação blast2go: possível função envolvida na sequência; Comprimento unigene: comprimento do fragmento; SSR nr: número de microssatélites encontrados; SSR: motivo do microssatélite; Tamanho em pares de bases (pb).

ID	Anotação blast2go	Comprimento unigene	SSR nr.	SSR	Tamanho (pb)
_Locus_9701	10 kda chaperonin	607	1	(AG)6	12
_Locus_10464	10 kda chaperonin	595	1	(AG)6	12
_Locus_6533	33 kda chloroplastic-like	685	1	(GA)15	30
_Locus_10557	39s ribosomal protein mitochondrial-like	1031	1	(GCG)6	18
_Locus_6883	40s ribosomal protein s11	349	1	(GA)7	14
_Locus_6913	40s ribosomal protein s11	370	1	(TC)7	14
_Locus_773	60s ribosomal protein s24	722	1	(CGG)5	15
_Locus_895	60s ribosomal protein s24	775	1	(CGG)5	15
_Locus_5770	60s ribosomal protein s24	803	1	(CCG)5	15
_Locus_5807	60s ribosomal protein s24	801	1	(CCG)5	15
_Locus_908	abc transporter f family ember 5-like	3008	1	(AG)11	22
_Locus_2076	abc transporter f family ember 5-like	2496	1	(AG)11	22
_Locus_1949	abc transporter f family ember 5-like	1987	1	(CT)10	20
_Locus_7552	adagio protein 3-like	2148	3	(TC)8	16
_Locus_14741	adagio protein 3-like	2152	2	(CGT)5	15
_Locus_3748	adp-ribosylation factor 3	934	1	(AG)7	14
_Locus_6	adp-ribosylation factor 3	770	1	(TC)17	34

_Locus_5247	amino acid binding	418	1	(AG)7	14
_Locus_14005	amp deaminase-like	408	2	(GGA)7	21
_Locus_15658	amp deaminase-like	463	1	(TC)7	14

Tabela 3. Desenho dos 30 *primers* promissores que delimitam regiões de microssatélites em *Vriesea carinata*. Nome e número: identificação do loco; Motivo: sequência e quantidade de sua repetição (causa do microssatélite); Tamanho: quantidade de nucleotídeos envolvidos no *primer*; TM: temperatura média de anelamento do *primer*; %GC: porcentagem de nucleotídeos Guanina e Citosina no *primer*; Primers: sequências do *primer*; LR: left (início) ou right (término) *primer*.

Nome	Número	Motivo	Tamanho	TM	%GC	PRIMERS	LR
>_Locus_1039	10	(TTG)5N(GTT)9N(TAT)7	236	57.15	36	AACTTGCTATGTCTAAAGGAATGG	L
				59.75	55	ACTCTGCGGCTGTTCTTCTC	R
>_Locus_1729	11	(ATA)7N(AAC)9N(CAA)5	236	59.75	55	ACTCTGCGGCTGTTCTTCTC	L
				57.15	36	AACTTGCTATGTCTAAAGGAATGG	R
>_Locus_3745	31	(AG)15	203	59.99	60	CCGTAGGCGACGATAGAGAG	L
				60.19	60	GTGGGGGAGGAGAGAGAAAG	R
>_Locus_3042	36	(CGC)7	248	60.18	55	CCGAAGTCTCTCCCTTTCC	L
				60.29	50	TCATTCGACTGCTTCTGCTG	R
>_Locus_8811	63	(TGC)11(TGCTGT)3	185	59.93	50	TGAAGCTGCTGTTGACTGCT	L
				59.60	50	GCAAACAGTGTCGGTGATGT	R
>_Locus_163	72	(CGC)7N(GTCCTC)3N(TCC)6	217	59.37	45	TTCTCAATCTCACCGACGA	L

				60.94	63.16	GCGAGGAGGACGATGACTC	R
>_Locus_2067	74	(GA)20	150	60.10	42.86	GTTTTTCTTGCTCCCATCA	L
				59.78	50	TCGCACAGCTCACACTTCTT	R
>_Locus_7552	91	(ACG)10	194	60.01	60	CGACCCACTCTTCGCTAGTC	L
				60.10	55	ATGCGGGAGTCCTCCTTACT	R
>_Locus_9575	93	(AG)8	219	60.15	45	TTGCCACAAAGACGTACCAA	L
				59.99	55	TGCTGGGAAGAGGTCAGACT	R
>_Locus_10	95	(TGCCAC)4N(CTT)6	185	60.25	45	CATTGGTGTGTTGGGTTC	L
				59.92	55	GAGATGGCTGAGGAAGATGC	R
>_Locus_10	95	(CT)11G(CT)8N(CT)16	209	59.85	55	GTGCCCTAACCTAACACCA	L
				60.69	50	GGGATCCGATCGATAACACA	R
>_Locus_32	115	(GA)8N(AG)7	187	60.49	45	CGCCATTATCAACGATCACA	L
				59.98	50	GGCGCTTATTTATGCTCTGC	R
>_Locus_12057	139	(AGG)6N(TGG)9N(GA)8	239	60.26	47.37	CCCCGAAATTGATCGAAAC	L
				59.82	55	GGTGAGTGAGATTGGGTGGT	R
>_Locus_5929	143	(CTC)9N(TAGGGT)2	235	60.11	45	CCCTCCCGATCGAATTTAT	L
				60.43	55	AGGAGCTCCGATCCATAACC	R
>_Locus_1554	153	(GCTGAA)2N(GCT)8N(CCTGCT)2	209	59.37	45	TGGATGTGAAGGAGCAGAAA	L
				60.55	45	ATGCAACAATCATGCAGTGG	R
>_Locus_6450	209	(CCG)6N(GGC)7	207	60.41	55	CATCTCTCCCTCCTCCATT	L
				60.23	63.16	CTGCTCCTCCAGAAGCTC	R
>_Locus_268	211	(CT)17	221	59.12	50	TGGAGCTTCTCCTCGATCTT	L

				59.07	45.45	AGGGAGAGTCATGTGTTTGATG	R
>_Locus_7447	227	(TG)17(GA)19	202	59.83	45.45	AAAGGGCTTAGTGTGTTTGAGC	L
				59.92	50	ATCCCGGATGCTAGGAAACT	R
>_Locus_14838	245	(AT)8	165	59.98	50	TGCAGAACGAGAACCAGATG	L
				59.62	45	GGGCGCGTAAATGTTTTTAG	R
>_Locus_10446	258	(CCT)9	213	59.65	50	TTCTTCGAGAGCTTCGATCC	L
				60.37	50	GAGTCAATGCGGAGAAGCAT	R
>_Locus_6050	280	(CT)8N(TC)7	202	60.58	47.62	CACAAAGCCACTCACAAAACC	L
				59.96	50	ACTGCCAATCCGGTATGAAG	R
>_Locus_6050	280	(CT)16N(AG)7	165	60.29	55	CGAGCCTAACTGCTGCTTTC	L
				60.35	47.37	AATCGCCTTTTCGCTTAC	R
>_Locus_4967	293	(CCT)9	245	60.20	50	TTCGGGAGCTCTAGGGTTTT	L
				59.46	55	CACCAACTCCTTCACAGCAG	R
>_Locus_4683	318	(AG)14N(AG)8	214	59.96	50	ACTGCCAATCCGGTATGAAG	L
				60.58	47.62	CACAAAGCCACTCACAAAACC	R
>_Locus_1554	320	(GCTGAA)2N(GCT)8N(CCTGCT)2	240	60.21	45	ACCAAAATGGAAGGTGTGGA	L
				60.55	45	ATGCAACAATCATGCAGTGG	R
>_Locus_785	366	(TC)8	163	59.87	50	ATTGCTGTGAGGCTGCCTAT	L
				59.28	55	TTAAGAGCCACCACCTCCTC	R
>_Locus_290	377	(CAAATC)2N(AT)9	231	58.75	50	CTTGGATCGATGCGTACCTA	L
				60.56	45	GGCCACAATAAAATGGGTCA	R
>_Locus_8191	395	(TTC)12	187	60.12	60	CGTATCTCCTCGTCGCTCTC	L

				58.23	61.11	CTGATCAGCTCCCCTTCC	R
>_Locus_10145	430	(AGC)7	231	60.11	50	ATGCTCCAGGTGGTTTTCTG	L
				60.06	50	GCTGCTGTTGTGCATGTCTT	R
>_Locus_17077	501	(AGAA)6	151	59.80	45	GATTCATGCGCGAGATTGTA	L
				60.02	55	ACGGTGGTAGCTCCAATACG	R

Em um primeiro momento, foi realizado um PCR com os 30 locos sintetizados em seis indivíduos de *V. carinata* e a posterior verificação em gel de agarose. Neste teste, 17 locos apresentaram amplificação satisfatória. Posteriormente, realizou-se um segundo teste, no qual foram repetidos os PCRs dos locos que amplificaram satisfatoriamente em gel de agarose, com a adição do terceiro *primer* M13. Esses produtos foram genotipados em sequenciador automático para verificação de polimorfismo. Dos 17 locos enviados, 13 amplificaram satisfatoriamente e 11 foram polimórficos nesses seis indivíduos primeiramente testados (Tabela 4).

Tabela 4: Descrição e caracterização dos 13 pares de *primers* que delimitam regiões de microssatélites em seis indivíduos de *Vriesea carinata*, incluindo nome dos locos, sequência do primer, motivo, número de alelos (A), tamanho do alelo.

NOME	PRIMERS	Motivo	A	Tamanho
Vcar_10	F: AACTTGTCTATGTCTAAAGGAATGG R: ACTCTGCGGCTGTTCTTCTC	(TTG)5N(GTT)9N(TAT)7	4	251-260
Vcar_11	F: ACTCTGCGGCTGTTCTTCTC R: AACTTGTCTATGTCTAAAGGAATGG	(ATA)7N(AAC)9N(CAA)5	5	248-257
Vcar_31	F: CCGTAGGCGACGATAGAGAG R: GTGGGGGAGGAGAGAGAAAAG	(AG)15	3	214-230
Vcar_72	F: TTCTCAATCTTCACCGACGA R: GCGAGGAGGACGATGACTC	(CGC)7N(GTCCTC)3N(TCC)6	5	233-237
Vcar_95.1	F: CATTGGTGTGTTGGGTTCA R: GAGATGGCTGAGGAAGATGC	(TGCCAC)4N(CTT)6	3	209-213
Vcar_115	F: CGCCATTATCAACGATCACA R: GGCGCTTATTTATGCTCTGC	(GA)8N(AG)7	6	203-211
Vcar_139	F: CCCCAGAAATTGATCGAAAC R: GGTGAGTGAGATTGGGTGGT	(AGG)6N(TGG)9N(GA)8	4	252-261
Vcar_143	F: CCCTCCCGATCGAATTTAT R: AGGAGCTCCGATCCATAACC	(CTC)9N(TAGGGT)2	2	251-256
Vcar_153	F: TGGATGTGAAGGAGCAGAAA R: ATGCAACAATCATGCAGTGG	(GCTGAA)2N(GCT)8N(CCTGCT)2	3	226-233
Vcar_258	F: TTCTTCGAGAGCTTCGATCC R: GAGTCAATGCGGAGAAGCAT	(CCT)9	6	235-241

Vcar_280	F: CACAAAGCCACTCACAAAACC R: ACTGCCAATCCGGTATGAAG	(CT)8N(TC)7	2	221-226
Vcar_93	F: TTGCCACAAAGACGTACCAA R: TGCTGGGAAGAGGTCAGACT	(AG)8	1	239
Vcar_91	F: CGACCCACTCTTCGCTAGTC R: ATGCGGGAGTCCTCCTTACT	(ACG)10	1	198

3.2. Polimorfismo dos microssatélites em *V. carinata*

Após o primeiro teste, os polimorfismos foram caracterizados em três populações naturais de *Vriesea carinata*, a fim de estimar a diversidade genética das mesmas. Foi encontrado que os 13 locos são polimórficos dentro dessas populações, onde o número de alelos variou de quatro a 15 com uma média de 7,23 alelos por loco. As heterozigosidades observada e esperada variaram de 0,2 a 0,832 e de 0,362 a 0,903, respectivamente. O conteúdo informativo de polimorfismo foi de 0,458 a 0,895, com uma média de 0,671 (Tabela 5). Exceto Vcar_91 (PIC = 0,458), todos os marcadores foram altamente informativos (PIC > 0,5) e podem ser úteis em estudos de diversidade genética. Sete locos mostraram desvio significativo de HWE entre todas as amostras (* P<0,05).

Tabela 5: Características dos 13 marcadores de microssatélites polimórficos desenvolvidos em *Vriesea carinata*. Todos os *primers forward* continham o primer M13 no final 5'. Ta = temperatura de anelamento (PCR). TD = programa “touchdown”, publicado por Palma-Silva *et al.* (2007); ST = reação padrão: 95 ° C por 3 min, 35 ciclos de 94 ° C por 30 s, 60 ° C por 30 s, 72 ° C por 30 s, e uma extensão final de 72 ° C por 10 min. Número de alelos (A), Tamanho em pares de base (pb), Heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E); conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) (* P<0,05).

Nome do Locus	Ta(°C)	N° de alelos (A)	Tamanho (bp)	H _O	H _E	PIC	F _{IS}
Vcar_10	TD-48	7	243-261	0,809	0,808	0,763	0,010
Vcar_115	TD-48	9	202-222	0,424	0,631	0,593	0,282*
Vcar_11	TD-48	4	246-255	0,433	0,651	0,678	0,185
Vcar_95.1	TD-48	7	200-218	0,482	0,695	0,724	0,299*
Vcar_258	TD-48	4	228-237	0,567	0,707	0,616	0,156
Vcar_31	ST-60	12	206-236	0,400	0,835	0,83	0,497*
Vcar_93	TD-48	15	229-259	0,832	0,903	0,895	0,100
Vcar_72	TD-48	4	228-237	0,280	0,661	0,598	0,600*
Vcar_91	TD-48	5	186-213	0,253	0,362	0,458	0,427*

Vcar_143	TD-48	7	240-264	0,578	0,588	0,557	0,004
Vcar_153	TD-48	5	222-234	0,387	0,603	0,567	0,360
Vcar_280.1	TD-48	8	220-238	0,200	0,664	0,662	0,794*
Vcar_139	TD-48	7	246-264	0,292	0,769	0,786	0,536*
Média		7,23		0,456	0,682	0,671	0,135

3.3. Análise de diversidade genética

Os resultados da análise de diversidade genética para as populações de *V. carinata* estão apresentados na Tabela 1 e 6. Os maiores valores para a riqueza alélica, heterozigosidades observada e esperada foram observados na população Ubatuba. As três populações apresentaram valores de coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) com desvios significativos de HWE, indicando uma deficiência de heterozigotos ou excesso de homozigotos.

Tabela 6: Resultados dos 13 locos de microssatélites em três populações de *Vriesea carinata*, incluindo o número de indivíduos amostrados (N), o número de alelos médio por loco (\bar{A}), o número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E); e o coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) (* $P < 0,05$).

Locos	Bertioga (N = 11)				Ubatuba (N= 13)				Morretes (N= 24)			
	A	H_O	H_E	F_{IS}	A	H_O	H_E	F_{IS}	A	H_O	H_E	F_{IS}
Vcar_10	7	0,636	0,792	0,204	7	1	0,836	-0,21	7	0,792	0,796	0,006*
Vcar_115	3	0,375	0,508	0,276	7	0,375	0,742	0,511*	7	0,522	0,642	0,191
Vcar_11	2	0	0,426	1	4	0,6	0,778	0,25	4	0,7	0,747	0,065
Vcar_95.1	5	0,444	0,673	0,353	3	0,4	0,622	0,385	7	0,6	0,788	0,245*
Vcar_258	3	0,6	0,711	0,172	3	0,5	0,75	0,368	3	0,6	0,659	0,093*
Vcar_31	7	0,5	0,837	0,415*	4	0,2	0,778	0,765*	10	0,5	0,889	0,451
Vcar_93	10	0,9	0,905	0,006	11	0,833	0,913	0,091	12	0,762	0,892	0,149
Vcar_72	3	0,25	0,692	0,654*	4	0,363	0,636	0,441	4	0,227	0,652	0,657
Vcar_91	1	0	0	0	3	0,6	0,61	0,018	5	0,158	0,476	0,675*
Vcar_143	3	0,4	0,542	0,273	6	0,833	0,717	-0,17	7	0,5	0,504	0,008
Vcar_153	4	0,454	0,762	0,415	2	0,308	0,443	0,314	5	0,4	0,604	0,343
Vcar_280.1	2	0	0,429	1	6	0,6	0,889	0,351	5	0	0,675	1*
Vcar_139	3	0	0,714	1*	5	0,5	0,768	0,359	5	0,375	0,825	0,562*
Média	4,07	0,350	0,614	0,370	5	0,512	0,729	0,199	6,23	0,472	0,703	0,266

3.4. Amplificação heteróloga

Os mesmos locos foram testados em outras espécies de bromélias a fim de verificar seu potencial para amplificação heteróloga. Dos 13 locos desenvolvidos, quatro amplificaram em mais de 50% das espécies (Tabela 7). O loco Vcar_153 amplificou em 13 espécies, seguido dos locos Vcar_258 (9), Vcar_143 e Vcar_115, cada um amplificando em oito espécies. Estes locos tiveram amplificação até mesmo em algumas espécies pertencentes a outras subfamílias que não Tillandsioideae, o que sugere a sua potencial utilidade em estudos de genética de populações envolvendo outras espécies de bromélias.

Tabela 7: Amplificação heteróloga dos 13 locos isolados de *Vriesea carinata* nas subfamílias Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae de Bromeliaceae. “+” indica amplificação satisfatória; “-” indica amplificação não satisfatória e “w”, do inglês *weak*, indica amplificações fracas.

Espécies	Subfamília	Vcar_ 10	Vcar_ 115	Vcar_ 11	Vcar_ 95.1	Vcar_ 258	Vcar_ 31	Vcar_ 93	Vcar_ 72	Vcar_ 91	Vcar_ 143	Vcar_ 153	Vcar_ 280.1	Vcar_ 139
<i>Alcantarea stensa</i>	Bromelioideae	-	+	w	-	+	+	-	-	-	+	+	-	w
<i>Bromelia antiacantha</i>	Bromelioideae	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	w
<i>Neoregelia laevis</i>	Bromelioideae	-	w	-	-	-	-	w	-	-	-	+	-	-
<i>Vriesea reitzii</i>	Tillandsioideae	-	+	w	+	w	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Vriesea altodasenae</i>	Tillandsioideae	-	+	-	+	-	-	w	-	-	+	+	-	-
<i>Vriesea philippocoburgii</i>	Tillandsioideae	-	+	-	+	-	-	w	-	-	+	+	-	-
<i>Aechmea calyculata</i>	Bromelioideae	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Dyckia grandedentata</i>	Pitcairnioideae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-
<i>Dyckia pottiorum</i>	Pitcairnioideae	w	w	-	-	w	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>Dyckia excelsa</i>	Pitcairnioideae	-	w	-	-	+	-	-	-	+	w	+	-	-
<i>Dyckia divaricata</i>	Pitcairnioideae	-	-	-	-	w	-	-	-	w	-	+	-	-
<i>Dyckia leptostackya</i>	Pitcairnioideae	-	-	-	-	+	-	w	-	w	+	+	-	-
<i>Aechmea comata</i>	Bromelioideae	-	-	-	-	w	-	-	-	-	w	-	-	-
<i>Aechmea kertesziae</i>	Bromelioideae	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-
<i>Aechmea caudata</i>	Bromelioideae	w	-	-	-	w	+	-	-	-	w	w	-	w

4. Discussão

Os 13 locos de microssatélites isolados de *Vriesea carinata* foram polimórficos nas três populações amostradas. Embora sete locos não estejam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o conteúdo informativo de polimorfismo foi alto em seis deles, o que demonstra o potencial dos mesmos para sua utilização em estudos de genética de populações e afins. O desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser explicado pelo pequeno tamanho efetivo das populações remanescentes após a fragmentação do habitat, devido ao endocruzamento ou deriva genética. Além disso, a deficiência de heterozigotidade em uma população pode ocorrer como resultado da seleção contra heterozigotos (Sun e Salomon, 2003).

Todas as populações avaliadas exibiram um excesso de homozigotos, similar a estudos anteriores com marcadores microssatélites para outras bromélias (Barbará *et al.*, 2007b; Palma-Silva *et al.*, 2009; Hmeljevski *et al.*, 2011; Zanella *et al.*, 2011, 2012, 2016). *Vriesea carinata* é uma espécie autocompatível (Martinelli, 1994; Wolowski *et al.*, 2013), uma característica predominante no gênero (Matallana *et al.*, 2010). Portanto, o endocruzamento em virtude da autofecundação, aliados com o cruzamento biparental podem ser fatores importantes envolvidos no excesso de homozigotos encontrados nessa espécie.

Os valores das heterozigotidades observada e esperada para *V. carinata* foram muito próximos aos encontrados por Palma-Silva (2008), para a espécie *Vriesea gigantea*, uma espécie com ampla distribuição e, assim como *Vriesea carinata*, diplóide ($2n = 2x = 50$, Palma-Silva, 2004), através da análise de SSRs ($H_O = 0,424$ e $H_E = 0,714$). Barbará *et al.* (2007b) também estudaram a diversidade genética de oito populações de duas espécies de bromélias, *Alcantarea imperialis* e *A. geniculata*. A heterozigotidade observada foi igual a 0,362 e 0,357, respectivamente. A heterozigotidade esperada foi de 0,615 para *A. imperialis* e de 0,429 para *A. geniculata*. Apesar dos valores de heterozigotidade observada serem relativamente altos, eles são diferentes dos esperados, o que demonstra que há um déficit de heterozigotos nessas espécies também. Resultados similares foram encontrados em estudos com plantas diploides e

de autofecundação em outras famílias, como Orchidaceae (Ross *et al.*, 2013; López-Roberts *et al.*, 2012; Humeau *et al.*, 2010).

Microssatélites são os marcadores genéticos mais utilizados para estudos de ecologia molecular. Entretanto, há carência de marcadores universais que possam rapidamente ser utilizados para mais de uma espécie, principalmente no caso de estudos que abrangem grupos ou complexos de espécies. Tal transferibilidade de marcadores facilita a comparação entre *taxa* estreitamente relacionados em estudos sobre a divergência entre populações e processos de especiação, bem como nas comparações entre múltiplas espécies coexistentes (Barbará *et al.*, 2007).

Pesquisas em andamento que visam avaliar os efeitos genéticos da fragmentação de habitat sobre a biodiversidade de locais considerados “hotspots”, como a Mata Atlântica, têm revelado que muitas espécies precisam ser estudadas de maneira comparativa (Myers *et al.*, 2000). No caso de *V. carinata*, a espécie está ameaçada principalmente devido à exploração madeireira e ao desenvolvimento urbano que reduzem os fragmentos remanescentes da vegetação em um ritmo bastante acelerado (DEC N°52.109, 2014). Essa mesma situação ocorre para diversas outras espécies endêmicas da Mata Atlântica, portanto um estudo comparativo entre elas seria de grande importância para melhor compreender este cenário.

Para uma amplificação ser considerada satisfatória o fragmento amplificado deve corresponder ao tamanho do fragmento esperado. Também se avalia a porcentagem de marcadores amplificados e, entre estes, a porcentagem de marcadores polimórficos (Barbará *et al.*, 2007). No presente trabalho, além do sucesso e polimorfismo das amplificações (Tabela 6) foi avaliada a possibilidade de transferência heteróloga dos locos (Tabela 7). O resultado da transferibilidade pode ser influenciado por três principais componentes: grupo taxonômico das espécies envolvidas, ou seja, a distância genética com base em dados de sequências de DNA; variáveis geográficas e biologia do organismo, ou seja, sistema reprodutivo, distribuição geográfica, área de distribuição e tempo de geração, uma vez que esses fatores podem estar relacionados com as taxas de evolução molecular que variam muito entre os *taxa* e com o tamanho do genoma (Chase *et al.*, 2005; Zhang & Hewitt, 2003; Barbará *et al.*, 2007).

A distribuição de transferência interespecífica de locos de microssatélites é altamente desigual entre os *taxa*, sendo maior nos animais e altamente variável nas plantas superiores. O potencial de uma transferência heteróloga de sucesso parece ser mais alto em espécies com longos tempos de geração, sistemas mistos de reprodução ou de cruzamento, e onde a diferença no tamanho do genoma das espécies alvo é pequena (Matallana *et al.*, 2010; Barbará *et al.*, 2007). O alto sucesso de amplificação dentro e entre os gêneros em muitos grupos de plantas indica um grande potencial para a utilização dos microssatélites de forma heteróloga. Neste trabalho, os locos de microssatélites desenvolvidos para *V. carinata* também amplificaram de forma satisfatória em espécies do gênero *Vriesea* e de outros gêneros, inclusive de outras subfamílias de Bromeliaceae (Tabela 7).

A transferabilidade dos marcadores polimórficos nas plantas é provável que seja bem-sucedida, principalmente dentro de gêneros (taxa de sucesso de cerca de 60% em eudicotiledôneas e perto de 40% nas monocotiledôneas) (Barbará *et al.*, 2007). No entanto, as plantas que sofreram grande radiação adaptativa e têm especiação recente, em geral apresentam baixos níveis de divergência nas suas sequências de DNA, tais como Bromeliaceae, onde marcadores polimórficos são facilmente transferidos entre espécies da mesma subfamília sendo as taxas de transferência de aproximadamente 10% entre gêneros (Palma-Silva *et al.* 2006; Barbará *et al.* 2007b). No presente estudo, as espécies da subfamília Tillandsioideae amplificaram satisfatoriamente em 41% dos locos, Pitcairnioideae contou com 30,76% de amplificação e Bromelioideae com 26,37%. *Vriesea carinata* pertence à subfamília Tillandsioideae, portanto era esperado que os locos desenvolvidos amplificassem em maior proporção nas espécies dessa subfamília. Apesar disso, segundo nossos resultados, muitos marcadores se mostraram altamente espécie-específicos. Este conjunto de marcadores microssatélites será útil não somente para o gênero, mas até mesmo para espécies de outras subfamílias de Bromeliaceae, aumentando o número de locos para análises.

Apesar dos aspectos apresentados, o potencial de transferência heteróloga de microssatélites é mais limitado do que os cientistas moleculares gostariam. Além disso, estudos de ecologia molecular frequentemente têm como objetivo comparar

parâmetros genéticos, demográficos, comportamentais, do sistema reprodutivo de espécies relacionadas ou múltiplas espécies que co-ocorrem na mesma comunidade (Palma-Silva *et al.*, 2007; Paggi *et al.*, 2008; Wörhmann e Weising, 2011; Wörhmann *et al.*, 2012, 2012b; Zanella *et al.*, 2012). Isto levanta questões sobre as diferenças em taxas de mutação, as restrições sobre a evolução de microssatélites, e homoplasia (Estoup & Cornuet, 1999; Amos, 1999). Várias fontes alternativas de marcadores nucleares que podem ser mais facilmente transferíveis estão atualmente em desenvolvimento. Este desenvolvimento, em combinação com o aumento da eficiência e custos decrescentes de sequenciamento de DNA, pode aumentar as chances de os pesquisadores terem novas ferramentas para este tipo de análise (Barbará *et al.*, 2007).

Os marcadores microssatélites desenvolvidos revelaram polimorfismo nas três populações de *V. carinata* estudadas, podendo ser úteis para o estudo da diversidade genética nessa espécie. Tendo em vista que a espécie apresenta populações pequenas, trabalhos futuros podem indicar que a mesma deva ser incluída na Lista de Espécies Ameaçadas da flora brasileira, visando sua sobrevivência a longo prazo, e poderão fazer a proposição de estratégias de conservação eficazes baseadas nos resultados obtidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amos W. (1999) A comparative approach to the study of microsatellite evolution. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein DB, Schlötterer C), pp. 66–79. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Aoki-Gonçalves, F., Louzada, R.B., Souza, L.M., Palma-Silva, C. (2014) Microsatellite loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to Neotropical rock outcrops. *Applications in Plant Sciences* 2 (3): 1300073.
- Barbará, T., Artinelli, G. M, Palma-Silva C., Fay M. F., Mayo S. J., Exer C. L. (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65 – 77.
- Barbará, T.; Palma-Silva, C.; Paggi, G.M.; Bered, F.; Fay, M.F.C.; Lexer, C. (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16:3759-3767.
- Barbará T., Martinelli G., Fay M. F., Mayo S. J., Lexer C. (2007b) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata*. *Molecular Ecology*, 16, 1981–1992.
- Benzing, D. H. (2000) *Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, 690 pp.
- Chase M. W., Salamin N., Wilkinson M. *et al.* (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360, 1889–1895.
- DECRETO Nº 52.109, DE 1º DE DEZEMBRO DE 2014, publicado no DOE nº 233, de 02 de dezembro de 2014.

- Dieringer, D. e Schlotterer, C. (2003) Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3: 167169.
- Doyle, J. J. e Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Estoup A., Cornuet J. M. (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. In: *Microsatellites. Evolution and Applications* (eds Goldstein DB, Schlotterer C), pp. 49–65. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Heredity* 86: 485-486.
- Guzman, F., Almerão, M.P., Korbes, A.P., Christoff, A.P., Zanella, C.M., Bered, F., Margis, R. (2013) Identification of potential miRNAs and their targets in *Vriesea carinata* (Poales, Bromeliaceae). *Plant Science* 210:214– 223
- Hmeljevski K. V., Reis A., Montagna T., Reis M. S. (2011) Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from southern Brazil. *Conservation Genetics* 12: 761–769.
- Humeau L., Dafreville S., Da Silva D., Rakotoarivelo F. P., Pailler T., *et al.* (2010) Isolation of 16 polymorphic microsatellite loci from *Jumellea rossii* (Orchidaceae) endemic to the Mascarene archipelago and cross-priming to other *Jumellea* species. *Molecular Ecology Resources* 10: 1098–1105.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Li, Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002) Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology* 11: 2453 – 2465.
- López-Roberts M. C.; Almeida P. R. M.; Oliveira E. J. F.; Van Den Berg C. (2012) Microsatellite marker development for the threatened orchid *Masdevallia*

solomonii (Orchidaceae) Published online before print 24 January 2012, doi: 10.3732/ajb.1100364 Am. J. Bot. February 2012 vol. 99 no. 2 e66-e68

Martinelli, G. (1994) Reproductive Biology of Bromeliaceae in the Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. Dissertação de Doutorado. University of St. Andrews, St. Andrews, 197p.

Matallana, G., Godinho, M. A. S., Guilherme, F. A. G., Belisaio, M., Coser, T. S., Wendt, T. (2010) Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Syst Evol* 2010, 289: 57-65.

Myers N., Mittermeier R. A., Mittermeier C. G., da Fonseca G. A. B., Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.

Oliveira, E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294 – 307.

Paggi, G. M., Palma-Silva, C., Bered, F., Cidade, F.W., Sousa, A. C. B., Souza, A. P., Wendt T e Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic rain forest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Resou* 8: 980-982.

Palma-Silva C (2008) Genética, Filogeografia e Fertilidade de populações de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Palma-Silva C., Cavallari M. M., Barbará T. *et al.* (2006) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01665.x.

Palma-Silva, C., Cavallari, M. M., Barbara, T., Lexer, C., Gimenes, A., Bered, F. e Bodanese-Zanettini, M. H. (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for

- Vriesea gigantea and Alcantarea imperialis (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads species. *Mol Ecol Notes* 7: 265-267.
- Palma-Silva C., Lexer C., Paggi G. M., Barbara T., Bered F., Bodanese-Zanettini M. H. (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- Palma-Silva C., Santos D. G., Kaltchuk-Santos E., Bodanese-Zanettini M. H. (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. *American Journal of Botany* 91: 804–807.
- Palma-Silva, C., Wendt, T., Pinheiro, F., Barbará, T., Fay, M. F., Cozzolino, S., Lexer, C. (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* 20: 3185 – 3201.
- Porembski S., Martinelli G., Ohlemuller R., Barthlott W., (1998) Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest, *Divers. Distrib.* 4 107–119.
- Ranker T.A., Soltis D.E., Soltis P.S., Gilmartin A.J. (1990) Subfamilial relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast DNA restriction site variation, *Syst. Bot.* 15 425–434.
- Raymond, M. e Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248-249.
- Ross A. A., Aldrich-Wolfe L., Lance S., Glenn T., Travers S. E. (2013) Microsatellite markers in the western prairie fringed orchid, *Platanthera praeclara* (Orchidaceae) *Appl Plant Sci.* 2013 Apr; 1(4): apps.1200413. Published online 2013 Mar 22. doi: 10.3732/apps.1200413
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233-234

- Sun G., Salomon B., (2003) Microsatellite variability and heterozygote deficiency in the arctic-alpine Alaskan wheatgrass (*Elymus alaskanus*) complex. *Genome* Oct, 46 (5): 729-37.
- Suresh, S., Park, J. H., Cho, G. T., Lee, H. S., Baek, H. J., Lee, S. Y., Chung, J. W. (2013) Development and molecular characterization of 55 novel polymorphic cDNA-SSR markers in faba bean (*Vicia faba* L.) using 454 pyrosequencing. *Molecules* (Basel, Switzerland) 18: 1844 – 1856.
- Wolowski M., Saad C. F., Ashman T. L., Freitas L. (2013) Predominance of self-compatibility in humming bird-pollinated plants in the Neotropics. *Naturwissenschaften* 100: 69–79.
- Wörhmann, T. e Weising, K. (2011) In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor Appl Genet* 123:635–647.
- Wörhmann, T., Pinagé, D.S.B., Krapp, F., Benko-Iseppon, A.M., Huettel, B., Weising, K., (2012) Conservation Genet. Resource. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686012-9738-y>
- Wörhmann T., Wagner N., Krapp F., Huettel B., Weising K. (2012) Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454-pyrosequencing. *American Journal of Botany* 99: e160–e163
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol.*, v.11, p.1–16.
- Zanella, C.M., Bruxel, M., Paggi, G.M., Goetze, M., Buttow, M.V., Cidade, F.W., Bered, F., (2011) High degrees of genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am. J. Bot.* 98, 1511-1519.

- Zanella C. M., Janke A., Palma-Silva C., Kaltchuk-Santos E., Pinheiro F. G., Paggi G. M., Soares L. E. S., Goetze M., Büttow M. V., Bered F. (2012) Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1020–1026.
- Zanella C. M., Palma-Silva C., Goetze M., Bered F. (2016) Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*, *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Zhang D. X., Hewitt G. M. (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol.*, 12, 563–584.

Capítulo 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Núcleo de Genética e Conservação de Plantas está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS (PPGBM). O grupo tem como linha de pesquisa central a genética e conservação de espécies de plantas Neotropicais com principal ênfase na família Bromeliaceae, utilizando diferentes abordagens e técnicas para resolver questões relacionadas à biologia, ecologia, genética e evolução de espécies deste grupo taxonômico.

As bromélias constituem a maior família de plantas típicas do Novo mundo, com distribuição geográfica restrita basicamente às Américas, apresentando três centros de diversidade: a Mata Atlântica no Brasil; as encostas Andinas do Peru, Colômbia e Equador; e no México, adjacente à América Central. Muitas espécies estão, atualmente, distribuídas em biomas ameaçados, e por serem endêmicas, ou ter uma distribuição restrita, a sobrevivência de muitos membros dessa família se encontra ameaçada. Por exemplo, a Mata Atlântica é um bioma bastante diverso com vários tipos de vegetação fortemente ameaçados. Nos últimos 28 anos, a Mata Atlântica perdeu 1.850.896 ha, ou 18.509 km² – o equivalente à área de 12 cidades de São Paulo. Atualmente, restam menos de 8,5% de remanescentes florestais acima de 100 ha. Somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 ha, restam 12,5% dos 1,3 milhões de km² originais (Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2012). Como a Mata Atlântica contém pelo menos 803 espécies de bromélias, das quais 653 são endêmicas e 40% estão ameaçadas, a preservação de tal bioma é vital para a conservação de Bromeliaceae (Martinelli *et al.*, 2008).

Poucos estudos de Bromeliaceae relacionam dados genéticos com planejamento de conservação. Muitos dados já apresentados indicam uma significativa redução na distribuição das espécies da família, comparados com os primeiros dados na literatura. A nossa equipe de trabalho está engajada não só na obtenção de dados que possam contribuir para uma melhor compreensão de muitos aspectos ainda desconhecidos para a maioria das espécies de bromélias da Mata Atlântica, mas principalmente comprometida com a integração desses dados para que haja um reconhecimento do

real panorama em que se encontram as populações naturais destas plantas. Acreditamos que dados genéticos, citogenéticos e reprodutivos, apresentados nos projetos em andamento do grupo serão essenciais para o diagnóstico da real situação das espécies, para ajudar com o desenvolvimento de programas de conservação e para elucidar aspectos da evolução e alterações ambientais e climáticas acerca de Bromeliaceae e da Mata Atlântica.

Os resultados aqui descritos indicam a efetividade dos locos de microsatélites, desenvolvidos *in silico* a partir de dados de NGS, para a caracterização da diversidade genética de *Vriesea carinata*. Neste contexto, esses marcadores representam uma excelente ferramenta para estudos futuros sobre a diversidade genética e estruturação de populações de diferentes espécies, principalmente daquelas pertencentes a Tillandsioideae. Os locos desenvolvidos foram bastante eficientes também na transferabilidade dentro de Bromeliaceae. Este resultado é muito importante, já que os mesmos poderão ser utilizados neste grupo de plantas de forma abrangente, o que pode ser bastante útil, já que a maioria das espécies são endêmicas e habitam regiões com problemas de fragmentação.

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê."*

- Arthur Schopenhauer

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Amos W. (1999) A comparative approach to the study of microsatellite evolution. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein DB, Schlötterer C), pp. 66–79. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Aoki-Gonçalves, F., Louzada, R.B., Souza, L.M., Palma-Silva, C. (2014) Microsatellite loci for *Orthophytum ophiuroides* (Bromelioideae, Bromeliaceae) species adapted to Neotropical rock outcrops. *Applications in Plant Sciences* 2 (3): 1300073.
- Barbará, T., Artinelli, G. M, Palma-Silva C., Fay M. F., Mayo S. J., Exer C. L. (2009) Genetic relationships and variation in reproductive strategies in four closely related bromeliads adapted to neotropical ‘inselbergs’: *Alcantarea glaziouana*, *A. regina*, *A. geniculata* and *A. imperialis* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 103: 65 – 77.
- Barbará, T.; Palma-Silva, C.; Paggi, G.M.; Bered, F.; Fay, M.F.C.; Lexer, C. (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16:3759-3767.
- Barbará T., Martinelli G., Fay M. F., Mayo S. J., Lexer C. (2007b) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *A. geniculata*. *Molecular Ecology*, 16, 1981–1992.
- Benzing, D. H. (2000) *Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, 690 pp.
- Bernardes, V. (2014) Isolamento, caracterização e transferabilidade de marcadores microssatélites de *Byrsonima Cydoniifolia* A. JUSS. (Malpighiaceae). Dissertação de Mestrado, Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás.
- Boneh, L., Kuperus, P. e Van Tienderen, P. H. (2003) Microsatellites in bromeliads *Tillandsia faciculata* and *Guzmania monostachya*. *Mol Ecol Notes* 3: 302-303.
- Buschiazzo, E.; Gemmell, N. J. (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*, v.28, n.10, p. 1040–1050.

- Caixeta, E. T., Oliveira, A. C. B., Brito, G. G., Sakiyama, N. S. (2006) Tipos de Marcadores Moleculares. In: Aluizio Borém; Eveline Teixeira Caixeta. (Org.). Marcadores Moleculares. 1a.ed. Viçosa, MG: Editora Jard, v. 1, p. 307-374.
- Caminhas, M.M.T.; Bertolozzi, J.; Chamma, O.S.; Curi, P.R. (1992) Grupos sanguíneos de bovinos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.27, n.8, p.1195-1200.
- Chase M. W., Salamin N., Wilkinson M. *et al.* (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 360, 1889–1895.
- Costa, A. F. da; Wendt, T. (2007) Bromeliaceae na Região de Macaé de Cima, Nova Fraiburgo, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia 58(4): 905-939. Disponível em: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br/rodrig58_4/001-07.pdf>.
- Costa C, *et al.* (2015) New Mechanisms of Flucytosine Resistance in *C. glabrata* Unveiled by a Chemogenomics Analysis in *S. cerevisiae*. PLoS One 10(8):e0135110.
- DECRETO Nº 52.109, DE 1º DE DEZEMBRO DE 2014, publicado no DOE nº 233, de 02 de dezembro de 2014.
- Dieringer, D. e Schlotterer, C. (2003) Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Mol Ecol Notes 3: 167169.
- Doyle, J. J. e Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Duran, C.; Appleby, N. Edwards, D.; Batley. (2009) Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. Current Bioinformatics, v. 4, p. 16-27.
- Ellegren, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, v.5, n.6, p. 435–445.
- Estoup A., Cornuet J. M. (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data. In: Microsatellites. Evolution and Applications (eds Goldstein DB, Schlotterer C), pp. 49–65. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Frankham, R., Ballou, J. D., & D. A. Briscoe. (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Editora SBG, Ribeirão Preto, SP.
- Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2012) <https://www.sosma.org.br/17811/divulgados-novos-dados-sobre-o-desmatamento-da-mata-atlantica/> Acessado em: novembro de 2016.
- Galetti Jr, P. M., Rodrigues, F. P., Solé-Cava, A., Miyaki, C. Y., Carvalho, D., Eizirik, E., Veasey, E. A., Santos, F. R., Farias, I. P., Vianna, J. A., Oliveira, L. R., Weber, L. I., Almeida-Toledo, L. F., Francisco, M. R., Redondo, R. A. F., Siciliano, S., Del Lama, S. N., Freitas, T. R.O., Hrbek, T., Molina, W. F. (2008) Genética da conservação brasileira. pp.244-274. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, SP, Editora SBG, 290p.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Berry, P.E., Sytsma, K.J., (2007) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. In: Columbus, J.T., Friar, E.A., Porter, J.M., Prince, L.M., Simpson, M.G. (Eds.), Monocots: Comparative Biology and Evolution – Poales. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, California.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J., (2011) Adaptive radiation and diversification in Bromeliaceae: insights from a 7-locus plastid phylogeny. Am. J. Bot. 98.
- Goetze, M., Louzada, R.B., Wanderley, M.G.L., Souza, L.M., Bered, F., Palma-Silva, C. (2013) Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Aechmea caudata* (Bromeliaceae) and cross-species amplification in other bromeliads. Bioch Syst Ecol 48: 194-198.
- Gouda, E.J., Butcher, D. & Gouda, C.S. (cont.updated) Encyclopaedia of Bromeliads, Version 3. <http://encyclopedia.florapix.nl/>. University Botanic Gardens, Utrecht (accessed: 2016).

- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Heredity* 86: 485-486.
- Gregory S. Kelly, A.N.D. (1996) Bromelain: A Literature Review and Discussion of its Therapeutic Applications (*Alt Med Rev*;1(4):243-257).
- Guzman, F., Almerão, M.P., Korbes, A.P., Christoff, A.P., Zanella, C.M., Bered, F., Margis, R. (2013) Identification of potential miRNAs and their targets in *Vriesea carinata* (Poales, Bromeliaceae). *Plant Science* 210:214– 223
- Hmeljevski , K.V., Ciampi, M.B., Baldauf, C. , Reis, M.S., Forzza, R.C. (2013) Development of SSR Markers for *Encholirium horridum* (Bromeliaceae) and Transferability to Other Pitcairnioideae. *Applications in Plant Sciences* 1 (4): 1200445.
- Hmeljevski K. V., Reis A., Montagna T., Reis M. S. (2011) Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from southern Brazil. *Conservation Genetics* 12: 761–769.
- Humeau L., Dafreville S., Da Silva D., Rakotoarivelo F. P., Paillet T., *et al.* (2010) Isolation of 16 polymorphic microsatellite loci from *Jumellea rossii* (Orchidaceae) endemic to the Mascarene archipelago and cross-priming to other *Jumellea* species. *Molecular Ecology Resources* 10: 1098–1105.
- Jarne, P. e Lagoda, P. J. L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* 11:424-429, n.10.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Li, Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002) Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology* 11: 2453 – 2465.
- López-Roberts M. C.; Almeida P. R. M.; Oliveira E. J. F.; Van Den Berg C. (2012) Microsatellite marker development for the threatened orchid *Masdevallia*

solomonii (Orchidaceae) Published online before print 24 January 2012, doi: 10.3732/ajb.1100364 Am. J. Bot. February 2012 vol. 99 no. 2 e66-e68

- Martinelli, G. (1994) Reproductive Biology of Bromeliaceae in the Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. Dissertação de Doutorado. University of St. Andrews, St. Andrews, 197p.
- Martinelli, G., Vieira, C. M., Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, A. e Forzza, R. C. (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59 (1): 209-258.
- Matallana, G., Godinho, M. A. S., Guilherme, F. A. G., Belisaio, M., Coser, T. S., Wendt, T. (2010) Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Syst Evol* 2010, 289: 57-65.
- Myers N., Mittermeier R. A., Mittermeier C. G., da Fonseca G. A. B., Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.
- Oliveira, E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294 – 307.
- Oliveira, H. H. P.; Silva, D. M. E.; Cruz, A. D. (2011) Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites do genoma de *Hypsiboas albopunctatus* (Anura, Hylidae) do cerrado Goiano. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- Paggi, G. M., Palma-Silva, C., Bered, F., Cidade, F.W., Sousa, A. C. B., Souza, A. P., Wendt T e Lexer C (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae), an endemic bromeliad from the Atlantic rain forest, and cross-amplification in other species. *Mol Ecol Resou* 8: 980-982.
- Palma-Silva C (2008) Genética, Filogeografia e Fertilidade de populações de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

- Palma-Silva C., Cavallari M. M., Barbará T. *et al.* (2006) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01665.x.
- Palma-Silva, C., Cavallari, M. M., Barbara, T., Lexer, C., Gimenes, A., Bered, F. e Bodanese-Zanettini, M. H. (2007) A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads species. *Mol Ecol Notes* 7: 265-267.
- Palma-Silva C., Lexer C., Paggi G. M., Barbara T., Bered F., Bodanese-Zanettini M. H. (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity* 103: 503–512.
- Palma-Silva C., Santos D. G., Kaltchuk-Santos E., Bodanese-Zanettini M. H. (2004) Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. *American Journal of Botany* 91: 804–807.
- Palma-Silva, C., Wendt, T., Pinheiro, F., Barbará, T., Fay, M. F., Cozzolino, S., Lexer, C. (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* 20: 3185 – 3201.
- Pinto, L. P. S., Costa, J. P. O., Fonseca, G. A. B., Costa, C. M. R. (1996) Mata Atlântica: Ciência, Conservação e Políticas. In: Workshop Científico Sobre a Mata Atlântica. Online. Disponível em: <http://www.aliancamataatlantica.org.br/limites.html>.
- Porembski S., Martinelli G., Ohlemuller R., Barthlott W., (1998) Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest, *Divers. Distrib.* 4 107–119.
- Powell, W., Macharay, G. C. e Provan, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1: 215-222.

- Primmer, C.R.; Merilä, J. (2002) A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics*, v.3, p.445-449.
- Ranker T.A., Soltis D.E., Soltis P.S., Gilmartin A.J. (1990) Subfamilial relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast DNA restriction site variation, *Syst. Bot.* 15 425–434.
- Rassmann, K., Schlötterer, C., Tautz, D. (1991) Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase in chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, v.12, p. 113-118.
- Raymond, M. e Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248-249.
- Reitz, R. 1983. Bromeliáceas e a Malária-Bromélia endêmica. Itajaí, SC.
- Rizzini, C.T. 1997. Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. Rio de Janeiro. 2ª ed. Âmbito Cultural Edições Ltda. 747p.
- Roder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Borner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., Ganai, M.W. (1998) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics*, v.246, p.327-333.
- Ross A. A., Aldrich-Wolfe L., Lance S., Glenn T., Travers S. E. (2013) Microsatellite markers in the western prairie fringed orchid, *Platanthera praeclara* (Orchidaceae) *Appl Plant Sci.* 2013 Apr; 1(4): apps.1200413. Published online 2013 Mar 22. doi: 10.3732/apps.1200413
- Sarthou, C., Boisselier-Dubayle, M. C., Lambourdiere, J. e Samadi, S. (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcainia geyskii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Mol Ecol Notes* 3: 221-223.
- Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, v.109, n.6, p. 365–371.

- Schlotterer, C. (2003) Hitchhiking mapping — functional genomics from the population genetics perspective. *Trends Genet.* 19, 32–38.
- Schlötterer, C. e Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20: 211-215.
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233-234
- Semagn, K., Bjørnstad, A., Ndjioudjop, M. N. (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.*, v.5, n.25, p.2540-2568.
- Smith, L.B. & Downs, R.J. (1974) Pitcairnoideae. (Bromeliaceae). *Fl. Neotrop. Monagr.* 14 (1): 1-658. The New York Botanical Garden, New York.
- Smith, L.B. & Downs, R.J. (1977) Tillandsioideae. *Fl. Neotrop. Monagr.* 14 (2): 663-1492. The New York Botanical Garden, New York.
- Smith L. B. & Downs R. J. (1979) Bromelioideae (Bromelioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 1443-2142.
- Soranzo, N., Provan, J. e Powell, W. (1999) An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42: 158-161.
- Sun G., Salomon B., (2003) Microsatellite variability and heterozygote deficiency in the arctic-alpine Alaskan wheatgrass (*Elymus alaskanus*) complex. *Genome* Oct, 46 (5): 729-37.
- Suresh, S., Park, J. H., Cho, G. T., Lee, H. S., Baek, H. J., Lee, S. Y., Chung, J. W. (2013) Development and molecular characterization of 55 novel polymorphic cDNA-SSR markers in faba bean (*Vicia faba* L.) using 454 pyrosequencing. *Molecules* (Basel, Switzerland) 18: 1844 – 1856.
- Tran, H. T., Keen, J. D., Kricker, M., Resnick, M. A. & Gordenin, D. A. (1997) Hypermutability of homonucleotide runs in mismatch repair and DNA polymerase proofreading yeast mutants. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2859–2865.

- Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrells, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, v.23, n.1.
- Wolowski M., Saad C. F., Ashman T. L., Freitas L. (2013) Predominance of self-compatibility in humming bird-pollinated plants in the Neotropics. *Naturwissenschaften* 100: 69–79.
- Wörhmann, T. e Weising, K. (2011) In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor Appl Genet* 123:635–647.
- Wörhmann, T., Pinagé, D.S.B., Krapp, F., Benko-Iseppon, A.M., Huettel, B., Weising, K., (2012) Conservation Genet. Resource. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686012-9738-y>
- Wörhmann T., Wagner N., Krapp F., Huettel B., Weising K. (2012) Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Bromeliaceae) using 454-pyrosequencing. *American Journal of Botany* 99: e160–e163
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol.*, v.11, p.1–16.
- Zanella, C.M., Bruxel, M., Paggi, G.M., Goetze, M., Buttow, M.V., Cidade, F.W., Bered, F., (2011) High degrees of genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *Am. J. Bot.* 98, 1511-1519.
- Zanella C. M., Janke A., Palma-Silva C., Kaltchuk-Santos E., Pinheiro F. G., Paggi G. M., Soares L. E. S., Goetze M., Buttow M. V., Bered F. (2012) Genetics, evolution, and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1020–1026.
- Zanella C. M., Palma-Silva C., Goetze M., Bered F. (2016) Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*, *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Zhang D. X., Hewitt G. M. (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol.*, 12, 563–584.