



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

FILOGENIA DE *MILTONIA* BASEADA EM DADOS DE SEQUÊNCIA DE DNA

André Pinto lima¹; Cássio van den Berg²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: andre8fs@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vcassio@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Sequenciamento de DNA, Orchidaceae, *Miltonia*

INTRODUÇÃO

O gênero *Miltonia* foi descrito por John Lindley em 1837, tendo como espécie-tipo *Miltonia spectabilis* Lindl. (Lindley 1837). O gênero é constituído por 11 espécies, sendo elas: *Miltonia candida* Lindl., *Miltonia clowesii* Lindl., *Miltonia cuneata* Lindl., *Miltonia flava* Lindl., *Miltonia flavescens* Lindl., *Miltonia kayasimae* Pabst, *Miltonia moreliana* A.Rich., *Miltonia phymatochila* (Lindl.) N.H.Williams & M.W.Chase, *Miltonia regnelii* Rchb.f., *Miltonia russeliana* (Lindl.) Lindl., *Miltonia spectabilis* Lindl. (van den Berg 2018).

Várias espécies andinas foram adicionadas ao gênero após a descrição das espécies brasileiras com suporte nos caracteres morfológicos próximos. Estudos envolvendo estas espécies que foram adicionadas ao gênero indicou que devem ser considerados como uma parcela de gêneros distintos (Williams *et al.* 2001).

Apesar dos trabalhos de filogenia de Oncidiinae, terem esclarecido o posicionamento filogenético de *Miltonia*, apenas quatro espécies do gênero foram incluídas nessas primeiras filogenias, que foram: *M. candida*, *M. flavescens* (Williams *et al.* 2001), *Miltonia phymatochila* e *M. regnelii* (Neubig *et al.* 2012). Essas filogenias foram baseadas em um marcador nuclear (Internal Transcribed Spacer - ITS), uma região não codificante de plastídeo (*trnL-F* íntron e espaçador) e o gene plastidial *matK*, *ycf1* e *rbcl*. Assim os trabalhos não se preocuparam em avaliar em detalhe o posicionamento de *Miltonia* nem a relação filogenética entre suas espécies.

Dentro desta perspectiva, o presente trabalho tem por objetivo esclarecer as relações filogenéticas das espécies do gênero *Miltonia* através da inclusão de todas as espécies conhecidas e uso de mais regiões de DNA (Orchidaceae).

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

As amostras foram coletadas em gel de CTAB 2% NaCl 35% e extraídos segundo uma modificação do protocolo de Doyle & Doyle (1987). As modificações incluíram uma lavagem inicial com STE (Sacarose Tris-EDTA) para reduzir a quantidade de polissacarídeos e retirada do NaCl do gel. Após a extração pelo protocolo padrão, os

DNAs das amostras foram quantificados em gel de agarose 2%, posteriormente aliquotadas, diluídas 10×, e armazenadas a -80C.

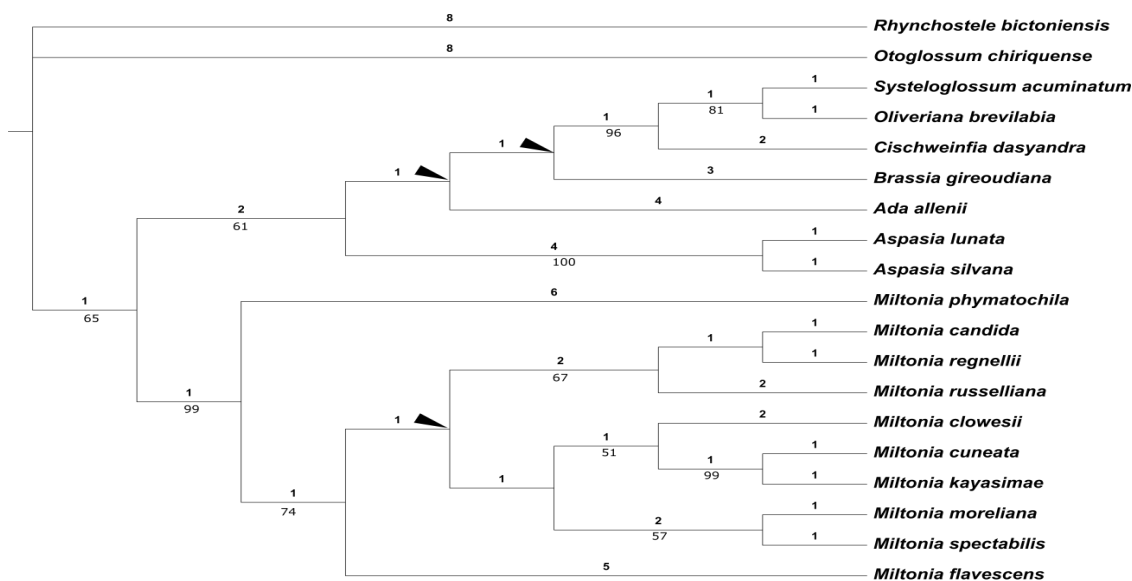
Para amplificação de regiões nucleares e plastidiais foram utilizados, sobretudo os *primers* de Shaw et al. (2005, 2007) e Scarcelli et al. (2010), seguindo os protocolos originais desses artigos. Após a amplificação foi feita uma limpeza com de purificação com precipitação por PEG-8000 11% e etanol (Paithankar & Prasad 1991), e em seguida foram sequenciados bidirecionalmente com o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI3130 XL disponível no laboratório. Os eletroferogramas obtidos foram editados e conferidos manualmente com o programa Pre-Gap 4 e Gap4 do pacote Staden (Staden et al. 2000). A partir das sequências consolidadas obtidas por este processo, foi realizada a construção matrizes alinhadas através do software MUSCLE (Edgar 2004), seguidos de correção manual.

As matrizes foram analisadas usando dois métodos, dependendo da quantidade de sequências. Para análises bayesianas foram feitas as corridas utilizando o MRBAYES v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012). Foram feitas duas corridas simultâneas com três cadeias quentes e uma fria, por um número de gerações necessário para que o desvio padrão entre os parâmetros das duas corridas seja menor que <0.01. Os resultados foram avaliados utilizando um consenso de maioria para inferir a topologia, comprimentos de ramos de verossimilhança e valores dos parâmetros, que é exportado para visualização no FigTree 1.4. (disponível de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Dos seis marcadores plastidiais e nuclear testados apenas um nuclear e 2 plastidiais foram utilizados nas análises para nuclear foi ITS e para plastidiais foram *rpl32-trnL* e *trnL-F*. As regiões *rps16-trnK*, *trnQ-rps16*, *atpI-atpH* e *matk* não foram utilizadas nas análises, devido á má qualidade das sequencias alcançadas, como a presença de microssatélites e sequencias curtas que não traziam informações para o estudo. Das 57 sequências analisadas no presente estudo, 19 foram de ITS, 19 de *rpl32-trnL*, e 19 de *trnL-F* dentre destas 21 foram retiradas do genbank. A matriz completa com todos os dados das três regiões utilizadas totalizou 3201 caracteres, sendo 830 caracteres referentes a nuclear e 2371 caracteres referentes aos plastidiais.

O gênero *Miltonia* foi fortemente sustentado como sendo um gênero monofilético, apresentando as mesmas relações filogenéticas na base do gênero que posiciona *Miltonia phymatochila* como espécie irmã do restante das espécies (Figura. 1). As outras espécies que compõe o gênero formam uma politomia constituída de quatro clados: (1) constituído por *M. candida*, *M. regnellii* e *M. russelliana*; (2) um clado *M. clowesii*, *M. cuneata* e *M. kayasimae*; (3) formado por *M. moreliana* e *M. spectabilis* e um (4) clado formado exclusivamente por *M. flavescens*.



▲ Colapsa no consenso estrito

Figura 1. Árvore do consenso estrito do gênero *Miltonia* das 1000 árvores mais parcimoniosas resultante da análise de Máxima Parcimônia feita com ITS, *rpl32-trnL* e *trnL-F* combinados. Valores das porcentagens de bootstrap da análise de parcimônia são mostrados abaixo dos ramos.

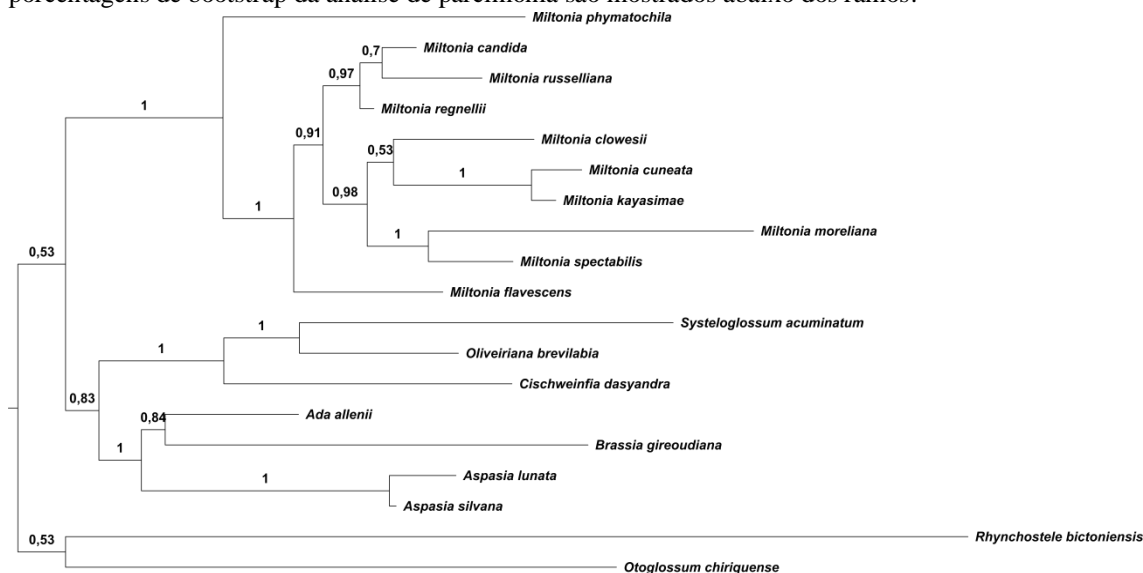


Figura 2. Árvore do consenso de maioria do gênero *Miltonia* das 15000 árvores obtidas na análise Bayesiana (ITS, *rpl32-trnL*, e 19 de *trnL-F*), com modelo de evolução = ITS1 e ITS2 foram modelados por GTR+G+I plastídeos pelo GTR+G. Os números acima dos ramos indicam as probabilidades posteriores para os cladogramas estimados pela proporção de ocorrência no conjunto de árvores.

Os resultados encontrados neste trabalho não corroboram o gênero *Anneliesia* proposto por Sengas (1997), que segundo esse autor seria composto por *Miltonia candida*, *Miltonia cuneata*, *Miltonia kayasimae* e *Miltonia russelliana*. Com base nas filogenias obtidas em nosso trabalho, este gênero proposto não pode ser sustentado, pois as espécies não formaram um clado coeso, mas pelo contrário, se espalharam em 2 cladogramas diferentes, entremeados com outras espécies. Para reconhecer *Anneliesia*, seria necessário manter apenas *M. candida* e *M. russelliana*, e ainda separar criar mais dois ou três gêneros para termos grupos monofiléticos. Nesse caso a solução mais simples é manter *Anneliesia* dentro de *Miltonia*.

Trabalhos envolvendo espécies do gênero foram realizados por (Williams *et al* 2001) e (Neubig *et al* 2012), foi realizado com um pequeno número de espécies onde não puderam esclarecer relações do gênero sendo utilizados duas plantas do gênero em cada trabalho, *Miltonia candida*, *Miltonia flavescens*, *Miltonia phymatochila* e *Miltonia regnelii* nas respectivas ordens dos trabalhos. No trabalho de Williams (2001) usando a *M. candida*, *M. flavescens*, estas duas espécies ficam em um clado separado nesta filogenia, em comparação com os resultados deste trabalho estas duas espécies ficam em cladogramas separados onde a *M. flavescens* se apresenta em um clado distinto sem nenhuma outra espécie do gênero. Já no trabalho realizado por Neubig (2012), usando *M. phymatochila* e *M. regnelii* elas também formaram cladogramas distintos, no presente trabalho a *M. phymatochila* se mostra como grupo irmão de *Miltonia*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As regiões de DNA utilizadas permitiram resolver a maior parte das questões filogenéticas em *Miltonia*, porém ainda seria preferível ter mais resolução dentro do gênero.

REFERÊNCIAS

- DOYLE, J. J. DOYLE, J. L. (1987). A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* 19: 11–15.
- LINDLEY, J. (1837) t. 1992. *Miltonia spectabilis*. *Edwards' Botanical Register* 23: t. 1992.
- EDGAR, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5: 113.
- NEUBIG, Kurt, et al. 2011. Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 168. 117 – 146.
- PAITHANKAR, K. R.; PRASAD, K. S. N. (1991). Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research* 19: 1991.
- POSADA, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- ROQUIST, F., TESLENKO eslenko, et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- STADEN, R., Beal, K. F.; BONFIEL, J. K. (2000). The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology* 132: 115–30.
- SCARCELLI, N., BARNAU, A., et al. (2011). A set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in monocotyledons. *PLoSOne* 6: e19954.
- SENGHAS, K. (1997) *Miltonia* und verwandte Gattungen. *Pfizeriana* 1: 1–109.
- SHAW, J., LICKY, E. B., et al. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166.
- van den BERG, C. (2018) *Miltonia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11859>>. Acesso em: 21 Fev. 2018.
- WILLIAMS, N. H., CHASE, M. W., FULCHER, T. & WHITTEN, W.M. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus. *Lindleyana* 17: 113-139.