



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 CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

FILOGENIA DE *LEPTOTES* BASEADO EM DADOS DE SEQUÊNCIAS DE DNA

Marvelle Vanilla de Abreu Cerqueira¹; Karena Mendes Pimenta²; Cassio van den Berg³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marvellevanilla@gmail.com
2. Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Botânica, Coorientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: karenamendes@hotmail.com
3. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vcassio@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Leptotes*, estudo filogenético, sequenciamento de DNA

INTRODUÇÃO

Orchidaceae A. Juss. é uma das maiores famílias de Angiospermas e está distribuída por quase todas as regiões do globo (Bastos *et al.* 2016). O Brasil detém uma das maiores diversidades de orquídeas do mundo, com cerca de 2.455 espécies das quais 1.579 são endêmicas deste país (Flora do Brasil, 2020). Entre os diversos gêneros, *Leptotes* destaca-se pela aparência delicada de suas espécies. Originalmente descrita por Lindley (1853), suas plantas possuem características epífitas, cespitosas, caule cilíndrico e espessado em pseudobulbo, coberto por bainha na base. Inflorescência em racemo, terminal; pedúnculo 4,0-12,0 mm comprimento, coberto por brácteas escariosas. Folha sub-cilíndrica, carnosa, canaliculada, 2,0-5,5cm compr., 0,2- 0,4cm largura e ápice agudo (Romanini, 2006).

Atualmente, o gênero *Leptotes* contém oito espécies em sua circunscrição, seis endêmicas do país, entre estas, três de ocorrência na Bahia e descritas em expedições botânicas mais recentes: *L. bohnkiana* Campacci, *L. pohlitinocoi* V.P. Castro & Chiron. e *L. vellozicola* van den Berg et al. O gênero pertence a subtribo *Laeliinea*, a qual possui grande diversidade morfológica, e sua delimitação tornou-se mais clara com os trabalhos moleculares de van den Berg *et al.* (2000, 2009), onde *Leptotes* apresenta-se como parte de um pequeno clado contendo vários gêneros endêmicos do leste do Brasil (*Constantia* Barb. Rodr., *Pseudolaelia* Porto & Brade, *Pygmaeorchis* Brade e *Isabelia* Barb. Rodr.), tendo como grupo irmão um gênero muito similar, *Loefgrenianthus* Hoehne (van den Berg 2009). Recentemente, outro gênero pertencente ao grupo foi encontrado na Bahia, *Adamantina* van den Berg e C. N. Gonç.

As filogenias realizadas por van den Berg et al. (2000, 2009), incluem poucas amostras de cada gênero e não possui muita variabilidade em algumas regiões. Desta forma, este trabalho mostra-se necessário para o aprofundamento do estudo filogenético do clado apresentado, incluindo as espécies recentemente descritas, assim como o gênero *Adamantina*, aparentemente relacionado e não posicionado. O objetivo do

projeto é esclarecer as relações filogenéticas das espécies de *Leptotes* e seu posicionamento dentro do clado que inclui *Constantia*, *Loefgrenianthus*, *Isabelia*, *Pseudolaelia*, *Pygmaeorchis* e *Adamantina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Foram utilizadas as seguintes amostras, da família *Orchidaceae*: *Leptotes bicolor* Lindl., *L. bohnkiana*, *L. tenuis* Rchb. f., *L. pohlitinocoi*, *L. serrulata* Lindl., *L. unicolor* Barb. Rodr., *L. vellozicola*, *Adamantina miltonioides* van den Berg & C. N. Gonç., *Constantia cristinae* F.E.L. Miranda, *Loefgrenianthus blanche-amesiae* Hoehne, *Isabelia virginalis* Barb Rodr., *Pseudolaelia pitengoensis* Campacci e *P. pavopolitana* M. Frey.

Foram executados protocolos de extração de DNA vegetal baseados em Doyle & Doyle (1987). Extraíu-se um total de sete amostras de DNA: quatro espécies do gênero *Leptotes*, uma *Adamantina* e duas *Pseudolaelias*, as demais foram adquiridas do banco de DNA do LAMOL. Os protocolos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foram otimizados para as condições do Termociclador e nucleotídeos. Foram feitos testes de amplificação com os genes *Internal Transcribed Spacers* (ITS) e *matK* e para os espaçadores *rps16-trnK*, *rps16-trnQ* e *rpl32-trnL*, ambos já estudados no LAMOL e considerados promissores para a resolução de filogenia em gêneros pequenos como *Leptotes*. Também foram realizados testes de qualidade para diferentes diluições de DNA (10×, 20× e DNA total).

Após amplificadas, as amostras foram analisadas em gel de agarose, no processo de eletroforese e sequenciadas bidirecionalmente com o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems), no sequenciador automático ABI3130 XL disponível no laboratório. Para amostras que apresentaram problemas no processo de sequenciamento, utilizou-se material do Genbank.

Foi executada uma Análise Bayesiana utilizando uma matriz combinada com as sequências obtidas. Além disso, realizou-se Análise de Máxima Parcimônia, com parcimônia de Fitch (1971), e buscas heurísticas utilizando o software Paup 4.0. O suporte dessas análises foi realizado com pseudoreplicações de bootstrap. Foram adicionadas à matriz, como grupo externo, sequências de *Prosthechea mariae* W. E. Higgins e *Alamania punicea* Lex, obtidas do Genbank.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As regiões de DNA utilizadas apresentaram resultados satisfatórios nos protocolos de amplificação e sequenciamento. A região nuclear (ITS) e o espaçador *rps16-trnK* mostraram-se promissoras para variabilidade genética entre o grupo estudado. As amostras diluídas a 20×, para as regiões plastidiais (*matK*, *rpl32-trnL* e *rps16-trnK*) e 10× para nuclear (ITS), apresentaram melhores resultados nos padrões de bandas.

A partir de sequências das espécies selecionadas, de um grupo escolhido de gêneros da subtribo Laeliinae, contendo *Leptotes* e gêneros relacionados, foi possível

realizar duas análises (Figura 1): Análise Bayesiana (A) e Análise de Máxima Parcimônia (B). As árvores foram geradas com matrizes de *matK*, *rps16-trnK* e ITS.

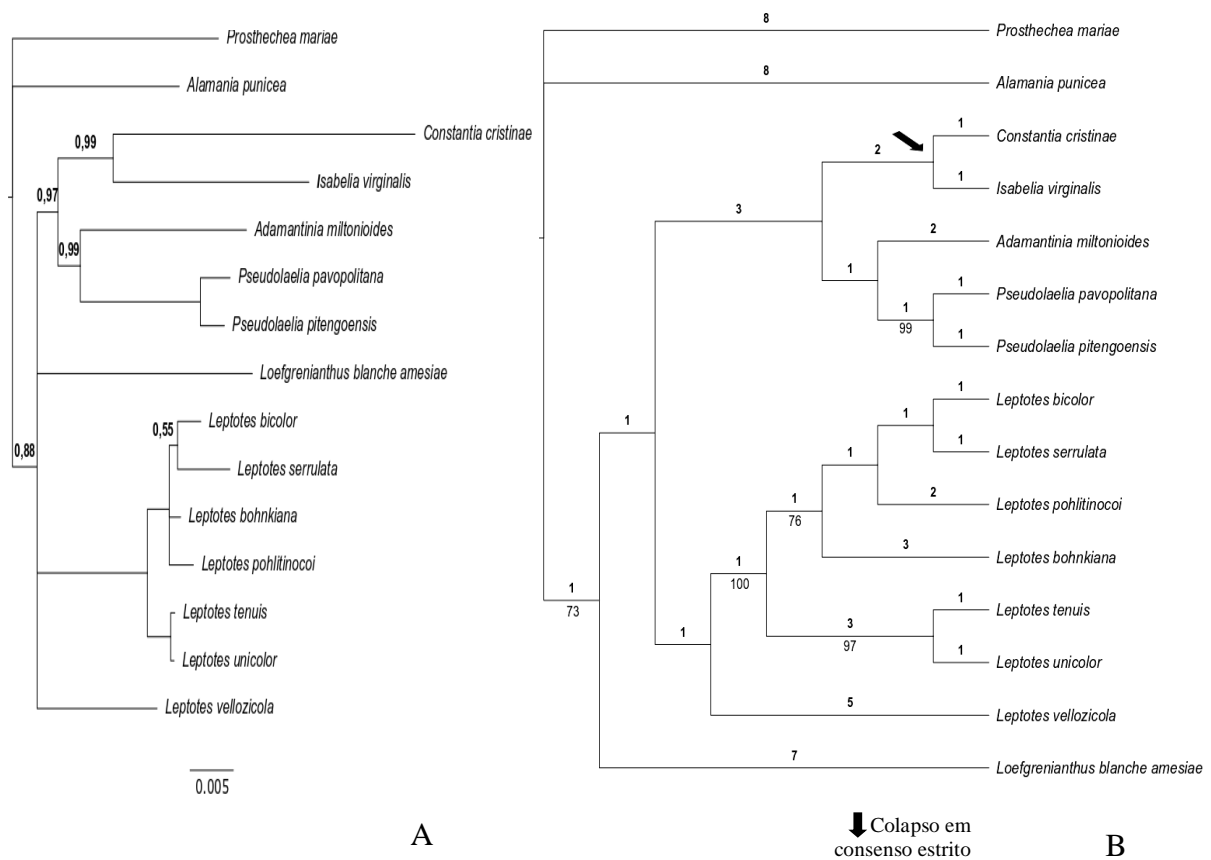


Figura 1: Árvores filogenéticas propostas para as espécies selecionadas do grupo incluso na seção *Laeliinae*, contendo *Leptotes* e gêneros relacionados, gerada a partir de sequências das regiões de plastídeo *matK* e *rps16-trnK* (espaçador) e nuclear ITS. **A.** Árvore Bayesiana de consenso em maioria da análise IB. Números acima dos ramos representam as probabilidades posteriores (PP), e a barra inferior corresponde ao número de mutações esperadas. **B.** Árvore de Máxima Parcimônia. Números acima dos ramos são comprimentos de Fitch e números abaixo dos ramos são porcentagens de bootstrap, grau estatístico de suporte aos nós nas árvores (quanto mais próximo a 100, maior a resolução do grupo; valores < 70% não foram incluídos).

Na árvore Bayesiana (A), pode-se observar a presença de quatro grupos. O primeiro grupo possui formação com alto suporte (0.97), contendo os gêneros relacionados a *Leptotes*: *Constantia*, *Isabelia*, *Adamantina* e *Pseudolaelias*; o segundo grupo contém o gênero monotípico *Loefgrenianthus*; o terceiro grupo recuperou *Leptotes bicolor*, *L. serrulata*, *L. bohnkiana*, *L. pohlitinocoi*, *L. tenuis* e *L. unicolor*; o último clado corresponde apenas a *L. vellozicola*.

A análise de Máxima Parcimônia (B), recuperou três grupos. O primeiro grupo é similar ao mesmo mostrado em Bayesiana, contendo os mesmos gêneros. O segundo grupo é composto por todas as espécies de *Leptotes* (porém com suporte inferior a 50%), indicando monofiletismo. O último clado é formado apenas por *Loefgrenianthus*.

Na análise Bayesiana, o suporte nos clados contendo *Constantia* e *Isabelia* foi forte (>0.95), como no trabalho de van den Berg *et al.* (2009). Porém o mesmo não ocorreu na árvore de Máxima Parcimônia, havendo colapso entre esses gêneros, indicando presença de politomia - incertezas sobre relações filogenéticas

Pode-se observar, nas duas árvores, alto suporte no clado em que mostra a aproximação entre *Adamantina* e *Pseudolaelias*, o que pode ser associado ao porte da planta, inflorescência longa e com floração sucessiva. Diferentes resultados foram

apresentados por van den Berg e Gonçalves (2004), onde o gênero apareceu perto de *Leptotes*, porém o estudo filogenético envolveu apenas uma região plastidial de DNA, *trnL-F*. De forma geral, as análises confirmam a inclusão de *Adamantina* no grupo estudado.

Em ambas as árvores, *Loefgrenianthus* mostra-se filogeneticamente como grupo irmão de *Leptotes*, porém as análises recuperaram posicionamentos diferentes para o gênero, não esclarecendo seu posicionamento dentro do grupo.

Na Bayesiana, *Leptotes vellozicola* não foi recuperado no mesmo grupo que as demais *Leptotes*, ficando em uma posição não resolvida. *Leptotes bicolor* e *L. serrulata* são consideradas sinônimos (Flora do Brasil, 2020), informações que podem ser sustentadas nas duas análises.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o aprendizado de técnicas laboratoriais, foi possível otimizar protocolos de extração, amplificação e sequenciamento de DNA e desenvolver um estudo filogenético básico do grupo contendo *Leptotes* e gêneros relacionados.

A matriz obtida foi suficiente para realização de duas análises filogenéticas que apresentaram resultados distintos, mas satisfatórios para esclarecimento do posicionamento de *Adamantina* dentro do grupo estudado. A quantidade de regiões utilizadas não foi suficiente para obter bons valores de suporte que auxiliem no esclarecimento do posicionamento de todas as plantas utilizadas, indicando a necessidade de mais dados de outras regiões de DNA.

REFERÊNCIAS

- BASTOS, C. A., MENEGUZZO, T., van den BERG, C. 2016. Flora da Bahia: *Encyclia* (*Orchidaceae*). *Sitientibus* série Ciências Biológicas. 16.10.13102/scb897.
- BFG. 2020. *Orchidaceae* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 02 ago. 2019.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- FITCH, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406–416
- ROMANINI, R., P. 2006. *A família Orchidaceae no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP*. São Paulo - SP. 321 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- van den BERG, C. 2000. A phylogenetic analysis of *Laeliinae* (*Orchidaceae*) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*. 15(2):96-114.
- van den BERG, C., HIGGINS, W. E., DRESSLER, R. L., WHITTEN, W. M., SOTO-ARENAS, M. A., & CHASE, M. W. 2009. A phylogenetic study of *Laeliinae* (*Orchidaceae*) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* 104: 417–430.