UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº17.228 de 25/11/2016
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2021

FILOGENIA MOLECULAR DE *CRYPTOCHLOA* SWALLEN (POACEAE, BAMBUSOIDEAE, OLYREAE) COM BASE EM SEQUÊNCIAS DO DNA PLASTIDIAL E NUCLEAR

Ive Amelia Oliveira Silva[1]; Iasmin Laiane de Castro Oliveira[2]; Reyjane Patrícia de Oliveira[3]

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: iveamelia2000@gmail.com
2. Coorientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: iasminlaiane@gmail.com
3. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rpatricia@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Bambus herbáceos; Olyrinae; Sistemática.

INTRODUÇÃO

Bambus são membros de Bambusoideae, uma das doze subfamílias da família Poaceae, diversificada em ambientes florestais da América e Ásia (Clark & Oliveira 2018). Atualmente é dividida em três tribos: Arundinarieae, que inclui os bambus lenhosos temperados; Bambuseae, inclui os bambus lenhosos tropicais e Olyreae, que reúne os bambus herbáceos (Clark *et al.*, 2015).

Cryptochloa é um dos gêneros de Olyreae, caracterizado especialmente pelo estípete na base do antécio feminino, o qual é liso (Oliveira et al. 2006). Inclui pelo menos nove espécies (Clark & Oliveira 2018) e distribui-se do sul do México ao norte da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru, Amazônia Brasileira), e uma delas, *C. capillata* (Trin.) Soderstr., estende sua distribuição até a Floresta Atlântica (Judziewicz *et al.*, 1999). As relações filogenéticas sobre a linhagem que envolve esse gênero são ainda pouco estudadas e algumas espécies não são claramente delimitadas, sendo necessário investimento em estudos filogenéticos e taxonômicos nesse grupo, o qual tem sido representado nas filogenias por um número mínimo de amostras.

Por esse motivo, o presente trabalho foi baseado na ampliação da amostragem desse gênero para as filogenias previamente disponíveis. Isso inclui o aumento no número de espécies, múltiplos acessos de cada uma delas (quando possível) e múltiplas regiões do DNA plastidial e nuclear, com objetivo de complementar os estudos filogenéticos nessa tribo, testar o monofiletismo de *Cryptochloa*, entender possíveis relações internas no gênero e estudar caracteres morfológicos que possam ser interpretados como possíveis sinapomorfias que possam subsidiar a circunscrição do gênero e das espécies.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Esse estudo foi baseado na extração do DNA total de folhas coletadas em sílica gel, como parte de estudos prévios, e em materiais herborizados, cujo DNA foi extraído, quantificado e depositado no banco de DNAs do Laboratório de Sistemática Molecular da UEFS (LAMOL). A extração foi feita através do método de CTAB de Doyle & Doyle (1987) modificado para microtubos e purificado com clorofórmio/álcool isoamílico

(24:1). As amostras foram amplificadas através de reações da polimerase em cadeia (PCR), para regiões do DNA nuclear e plastidial informativas nesse grupo: intron *rpl32-trnL*, espaçadores *trnD-T* e *trnS-G* (genoma plastidial), e espaçador ITS do DNA nuclear, usando condições específicas para cada *primer* de acordo com protocolos já otimizados para o grupo (Oliveira *et al.*, 2014, Oliveira *et al.* 2020a,b). Como *ingroup*, foi usado o maior número possível de espécies da linhagem *Olyra-Cryptochloa* e afins, incluindo múltiplos acessos de espécies e morfotipos de *Cryptochloa*. *Buergersiochloa bambusoides* Pilg. foi utilizada como *outgroup*, seguindo as filogenias recentes citadas.

Os produtos de PCR foram purificados com polietileno glicol (PEG), sequenciados com o kit "Big-Dye Terminator Mix". As sequências foram editadas no Staden Package 2.0.0b10 released© e alinhados posteriormente na plataforma online GUIDANCE (Penn *et al.* 2010). Todas as sequências obtidas serão depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Os dados foram analisados através do PAUP* (Swofford 2002) utilizando parcimônia como critério de otimização e busca heurística para escolher as árvores mais parcimoniosas. Como suporte, foram utilizadas 2000 replicações de bootstrapping. Também foi realizada a análise de Máxima Verossimilhança utilizando o RAxML v.8.2.8 (Stamatakis, 2006) na plataforma online CIPRES Science Gateway v. 3.3 (Miller et al., 2010) com 1000 replicações de bootstrap rápido, de forma independentemente para cada região analisada do DNA. As árvores produzidas foram contrastadas, produzindo uma filogenia combinada. Com base nesses resultados, os principais grupos formados foram analisados do ponto de vista morfológico, na busca das principais sinapomorfias que sustentam os clados.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Foram analisadas amostras de 39 membros de Olyreae, sendo oito de *Cryptochloa* e 21 de outros gêneros de Olyrinae (12 gêneros e 26 espécies), na qual *Cryptochloa* está inserido. Foram usadas nove amostras de Parianinae (3 gên. / 9 spp.), subtribo irmã de Olyrinae; além de *B. bambusoides* (Buergersiochloinae). Após o sequenciamento, foram montadas matrizes individuais das regiões analisadas, sendo descrita aqui apenas a análise combinada do DNA nuclear + plastidial, cuja matriz totalizou 4155 caracteres. Destes, 721 pertencem ao ITS, 893 ao *trnS-trnG*, 1484 ao *trnD-trnT* e 1057 ao *rpl32-trnL*. Na análise de parcimônia foram encontradas, na busca heurística 12 árvores mais parcimoniosas para os dados de ITS com um total de 1104 passos. No total, 3015 caracteres foram constantes, 745 eram variáveis e informativos e 395 variáveis não informativos. Na figura 1 está apresentada a árvore obtida na análise de Máxima Verossimilhança com a inclusão dos valores de bootstrap da Máxima Parcimônia para os ramos equivalentes. Os ramos colapsados não estão indicados.

Parianinae e Olyrinae foram recuperadas como monofiléticas com alto suporte, bem como as relações da maioria dos seus gêneros. Foram recuperados quatro grandes clados em Olyrinae, um deles incluindo *Diandrolyra* Stapf como grupo irmão do clado formado por *Taquara* I.L.C. Oliveira & R.P.Oliveira + *Raddiella* Swallen + *Parodiolyra* Soderstr. & Zuloaga; o segundo clado é formado por *Piresia* Swallen; o terceiro por *Brasilochloa* R.P.Oliveira & L.G.Clark como grupo irmão de *Sucrea* Soderstr. + *Raddia* Bertol.; e o quarto inclui *Olyra latifólia* L. como irmã do clado formado por: (*O. bahiensis* R.P.Oliveira & Longhi-Wagner + ((*Lithachne* P. Beauv. + (*Arberella* Calder´n & Soderstr. + (*O. humilis* Nees + *O. glaberrima* Raddi))) + (*Cryptochloa*))). A maioria dos relacionamentos corrobora os estudos anteriores, inclusive o não monofiletismo de *Olyra* L. (Oliveira et al. 2014, Oliveira et al. 2020a,b). O monofiletismo de *Cryptochloa* foi aqui confirmado pela primeira vez, com base em uma maior amostragem, com 100% de suporte em ambas as metodologias (MV e MP). Dentro desse gênero, dois clados foram recuperados, um composto pelos múltiplos acessos de *C. capillata*, que é irmã de

C. unispiculata Soderstr., sendo todas as relações bem sustentadas. O três acessos de *C. strictiflora* (E. Fourn.) Swallen, coalesceram em um clado irmão de *C. granulifera* Swallen + (*C. decumbens* Soderstr. & Zuloaga + (*C. dressleri* Soderstr. + *C. variana* Swallen)), com suportes também consistentes. Com esses dados, foram verificados dois claros grupos de espécies dentro do gênero, um composto por *C. capillata* e *C. unispiculata*, e o outro com as demais espécies. Também permitiram analisar a relação de *C. granulifera* e *C. strictiflora*, consideradas sinônimos nesse momento, mas que foram recuperadas em diferentes clados e podem posteriormente ser tratadas como espécies independentes. Esses achados sugerem a continuação de estudos para entender melhor as relações de *Cryptochloa* dentro de Olyrinae, incluindo as espécies faltantes do gênero, *C. concinna* (Hook. f.) Swallen e *C. stapfiae* Baldini & O. Ortiz), para que sua evolução morfológica seja analisada, subsidiando também estudos biogeográficos no mesmo.

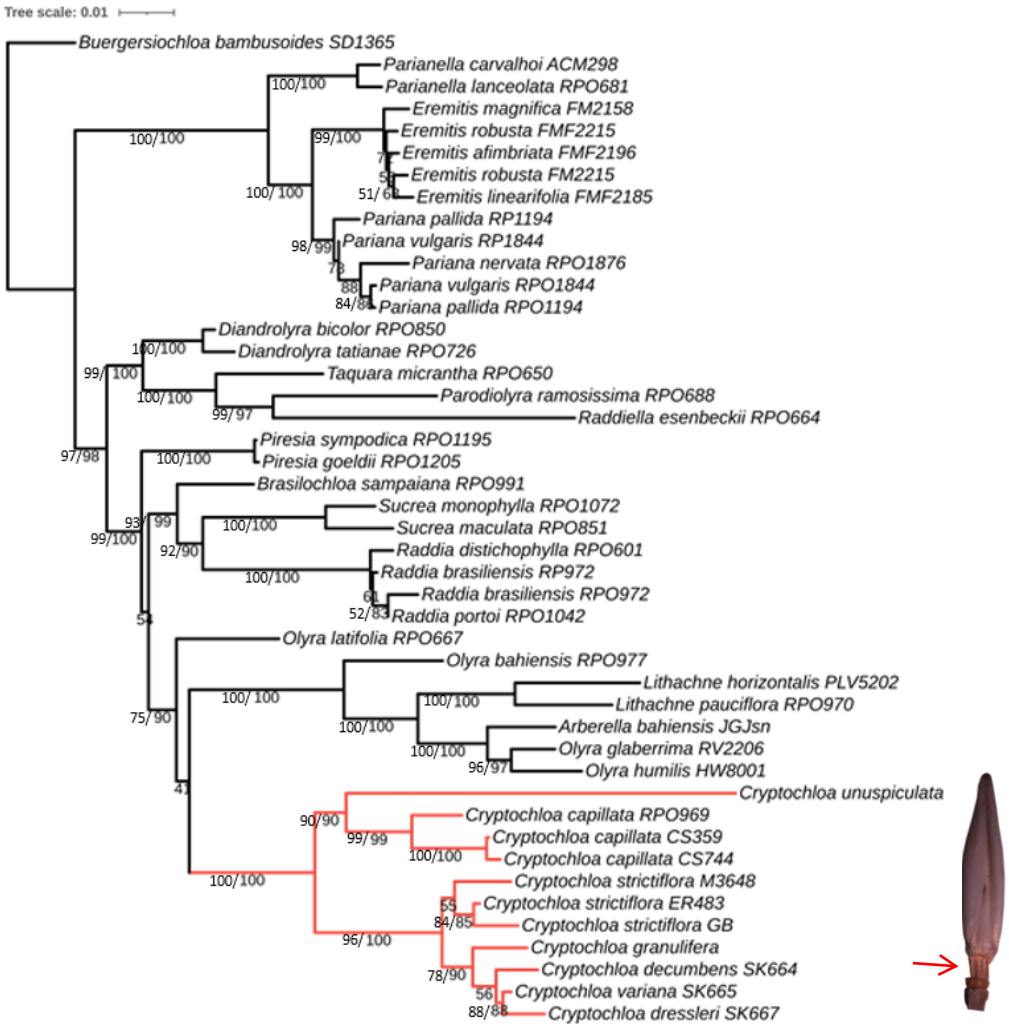

Figura 1: Árvore obtida a partir do método de Máxima Verossimilhança com dados da matriz combinada de todas as regiões analisadas. À esquerda dos ramos se encontram, em %, os valores de bootstrap; à direita dos ramos se encontram, em %, os valores de bootstrap para a árvore de Máxima Parcimônia. Em destaque, antécio feminino de *C. capillata* evidenciando o estípete na base, o qual é comum às demais espécies do gênero e pode representar uma potencial sinapomorfia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Cryptochloa foi recuperado como um gênero monofilético com suporte máximo nas duas análises, mas suas relações dentro da subtribo Olyrinae ainda são inconclusivas, devido à ausência de vários táxons de *Olyra*, o qual claramente não é monofilético. *Lithachne* e *Arberella* também são pouco representados nas filogenias, por isso é aqui

reforçada a necessidade de aumentar a amostragem também para os mesmos. Dentro de *Cryptochloa*, a delimitação das espécies precisa ser estudada com mais detalhe, o que não pôde ser feito durante o período da bolsa, devido à impossibilidade de amplo acesso às coleções de herbário por conta da pandemia de covid-19. As relações entre as espécies também precisam ser avaliadas em detalhe, incluindo a espécie tipo do gênero (*C. variana*) x *C. decumbens*; *C. capillata* x *C. soderstromii; C. strictiflora* x *C. granulifera*; além de *C. unispiculata*, que inclui amostras muito heterogêneas e podem incluir mais de uma espécie. Essa última, além de *C. capillata*, são as únicas do gênero ocorrentes no Brasil, o qual apresenta distribuição especialmente na América Central (Panamá). Porém, a diversidade do gênero deve ser maior do que se conhece, justificando a continuação dos estudos com o mesmo.

REFERÊNCIAS

CLARK, L.G.; OLIVEIRA, R.P. 2018. Diversity and evolution of the new world bamboos. *In:* Proceedings World Bamboo Congress, Mexico.

CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. 2015. Bamboo taxonomy and habitat. *In:* Bamboo . Springer, Cham, pp. 1-30.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; STERN, M.J. 1999. American bamboos. Smithsonian Institution Press.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. 2011. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. *In:* Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery, pp. 1-8.

OLIVEIRA, R.P.; LONGHI-WAGNER, H.M.; JARDIM, J.G.; ALMEIDA, J.G.; TEIXEIRA, A.A. 2006. Diversidade e conservação dos bambus herbáceos (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae) da Mata Atlântica, Brasil. *Simpósio Nacional sobre bambus*, 62-66.

OLIVEIRA, R.P.; CLARK, L.G.; SCHNADELBACH, A.S.; MONTEIRO, S.H.; BORBA, E.L.; LONGHI-WAGNER, H.M.; VAN DEN BERG, C. 2014. A molecular phylogeny of *Raddia* and its allies within the tribe Olyreae (Poaceae, Bambusoideae) based on noncoding plastid and nuclear spacers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78:105-117.

OLIVEIRA, I.L.C., MATOS, A.O.; SILVA, C.; CARVALHO, M.L.S.; TYRRELL, C.D.; CLARK, L.G.; OLIVEIRA, R.P. 2020a. Delving deeper into the phylogenetics of the herbaceous bamboos (Poaceae, Bambusoideae, Olyreae): evaluation of generic boundaries in the *Parodiolyra/Raddiella* clade uncovers a new genus. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 192:61–81.

OLIVEIRA, R.P.; SILVA, C.; WELKER, C.A.D.; DÓREA, M.D.; OLIVEIRA, I.L.C.; VIEIRA, J.P.S.; LEITE, R.B.; CLARK, L.G. 2020b. Reinterpreting the phylogenetic position, systematics and distribution of the Raddia-Sucrea lineage (Poaceae, Olyrinae), with a new monotypic and endangered herbaceous bamboo genus from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 192:34–60.

PENN, O.; PRIVMAN, E.; ASHKENAZY, H.; LANDAN, G.; GRAUR, D.; & PUPKO, T. 2010. GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic acids research*, 38: W23-W28.

STAMATAKIS, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21): 2688-2690.

SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10.