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

ACESSANDO A DIVERSIDADE DE *CHUSQUEA PINIFOLIA* (NEES) NEES POR MEIO DA FILOGENIA DE MÚLTIPLAS ESPÉCIES

Larissa Paim Santos Telles[1]; Reyjane Patrícia de Oliveira[2]; Evandro Pianissola Machado[3] e Kaio Vinicius de Araújo Vidal[3]

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: larissatelles2@gmail.com
2. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rpatricia@uefs.br
3. Doutorando PPGBOT, Universidade Estadual de Feira de Santana,

PALAVRAS-CHAVE: Bambusoideae, taxonomia, evolução.

INTRODUÇÃO

Por serem o foco de estudos em várias áreas do conhecimento, as espécies são consideradas a principal moeda da Biologia (Agapow *et al.*, 2004). Sendo assim, é muito importante que as mesmas tenham delimitações criteriosas, que conectem todo conhecimento adquirido aos organismos estudados (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Uma das espécies de bambus lenhosos endêmicas do Brasil, *Chusquea pinifolia* (Nees) Nees, apresenta ampla distribuição geográfica ao longo da região sudeste e sul (Clark, 1992) e grande variação morfológica, de modo suscitar dúvidas quanto à delimitação, com morfotipos identificados em estudos anteriores (Telles *et al.*, 2020).

O objetivo principal deste trabalho é usar dados de sequências do DNA em múltiplas amostras de *Chusquea pinifolia* a fim de tentar contribuir para esclarecer sua delimitação. Seguindo a tendência moderna da taxonomia integrativa (Schlick-Steiner *et al.*, 2010), esses dados serão comparados àqueles de modelagem ecológica de nichos, utilizando a coalescência de alelos para melhor compreender sua delimitação e relações entre seus morfotipos, que podem representar linhagens internas dessa espécie ou entidades independentes

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 57 amostras referentes a 39 táxons de *Chusquea* nesse estudo, incluindo espécies de *C.* subg. *Swallenochloa*, no qual *C. pinifolia* está inserido, de *C.* subg. *Chusquea*, de *C.* subg. *Rettbergia*, e uma espécie de *C.* subg. *Platonia*, selecionada como outgroup. Foram analisadas três regiões plastidiais (íntron *rpl16*, gene *ndhF* e espaçador intergênico *trnD-trnT)* previamente testadas no grupo (Fisher, *et al.* 2014; Vidal *et al.*, 2018). Foram utilizadas 157 sequências, 73 delas obtidas no GenBank e 84 sequências inéditas produzidas neste trabalho.

O DNA total foi extraído de folhas desidratadas em sílica-gel ou de amostras de herbário, com o protocolo de Doyle & Doyle (1987) e armazenadas no banco de DNAs do LAMOL/UEFS. O DNA foi amplificado via PCR, com parâmetros específicos para cada região. Os produtos das PCRs foram purificados com polietileno glicol 20% (PEG), com normalização das concentrações para sequenciamento, realizado na Macrogen e na Fiocruz Bahia. Os eletroferogramas foram conferidos e editados utilizando o Geneious Prime® 2021.2.2 (https://www.geneious.com), e as sequências alinhadas na plataforma online GUIDANCE2 Server (Sela *et al.*, 2015), com o algoritmo MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform), separadamente para cada região.

Dois métodos de inferência filogenética foram usados: Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (MV), sendo as regiões analisadas individualmente e de forma combinada. Possíveis incongruências entre as topologias foram avaliadas comparando o bootstrap dos clados seguindo Cardoso *et al*. (2013). A análise de MP foi feita no software PAUP* 4.0ba150a (Swofford, 2002) com busca heurística para obter as árvores mais parcimoniosas, e a análise de MV, na plataforma CIPRES Science Gateway v. 3.3 (Miller *et al*., 2010) utilizando o RaxML-HPC v8 on XSEDE (Stamatakis, 2014), com 1000 replicações de bootstrap para cada região analisada do DNA.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Não foram observadas incongruências nas topologias quanto ao grupo alvo desse estudo, por isso serão mostradas apenas as análises combinadas (Fig. 1). Tanto a MV quanto a MP recuperaram as espécies dos subgêneros *Swallenochloa* e *Chusquea* no clado informalmente chamado de Euchusquea, concordando com filogenias prévias de Fisher *et al.* (2014) e Vidal *et al.* (2018). Dentro de Euchusquea, a maioria dos clados inclui espécies com distribuição geográfica similar, também conforme tais autores, porém com menores suportes. Um dos clados recuperados compreendeu apenas espécies brasileiras de *Chusquea* (Fig. 1), incluindo as oito amostras de *C. pinifolia*, correspondentes a quatro dos sete morfotipos analisados por Telles *et al*. (2020). Porém, essa espécie não foi recuperada como monofilética, o que já era esperado devido à sua ampla variação morfológica (Clark, 1992; Telles *et al.*, 2020). Seus acessos tampouco foram recuperados em clados próximos, exceto aqueles provenientes da Serra do Caraça, com alto suporte, e os do PARNA Itatiaia e Parque Estadual Serra do Papagaio, duas localidades adjacentes, tendo forte relação com *C. imbricata* Pianiss., L.G. Clark & Santos-Gonç., endêmica do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. Nesse clado três acessos de *C. pinifolia* coalesceram, porém representam dois morfotipos distintos.

A maioria das relações recuperadas tem base geográfica, em detrimento dos aspectos morfológicos que subsidiam a taxonomia do grupo (Clark, 1992, Pianissola *et al.*, 2018), uma vez que outras espécies analisadas, usando múltiplos acessos, também não coalesceram (*C. baculifera*, *C.* aff *baculifera*, *C. heterophylla*, *C.* aff. *heterophylla* e *C. nutans*). O clado destacado em verde na figura 1 é composto por três espécies endêmicas no PARNA Caparaó, com suporte moderado; em azul escuro, duas espécies endêmicas de Santa Catarina foram recuperadas com suporte baixo; e em rosa, com alto suporte, um clado composto por duas espécies coletadas no Parque Estadual Serra do Brigadeiro. Relações baseadas em aspectos geográficos também foram evidenciadas por Fisher *et al.* (2014), mesmo sem o uso de múltiplos acessos. Entretanto, apesar do uso de múltiplos acessos para algumas espécies, Vidal *et al.* (2018) não identificaram relação geográfica nos clados obtidos para as espécies do Brasil, demonstrando que ainda são necessários mais estudos para se compreender melhor quais metodologias integrativas podem ser informativas para fins taxonômicos e evolutivos nesse gênero.

Como mencionado, inconguências entre os resultados de filogenias x morfologia em *Chusquea* têm sido recorrentemente documentadas, indicando padrões evolutivos complexos, o que pode ocorrer devido a diferentes processos, detectados em diferentes regiões genômicas (Duminil & Di Michele, 2009). Um destes é a hibridação, geralmente não esperada para bambus lenhosos devido aos longos ciclos de floração, mas o que tem sido documentado, inclusive em *Chusquea* (Clark, 1989), com base em indivíduos que florescem esporadicamente, podendo ocorrer floração síncrona entre algumas espécies (Clark, 1992). Isso reforça a importância do uso de múltiplas regiões do DNA de diferentes genomas (WANG *et al.*, 2000), assim como indica as limitações para uso dos marcadores plastidiais aqui utilizados, para recuperar relações taxonômicas em níveis específicos neste grupo.

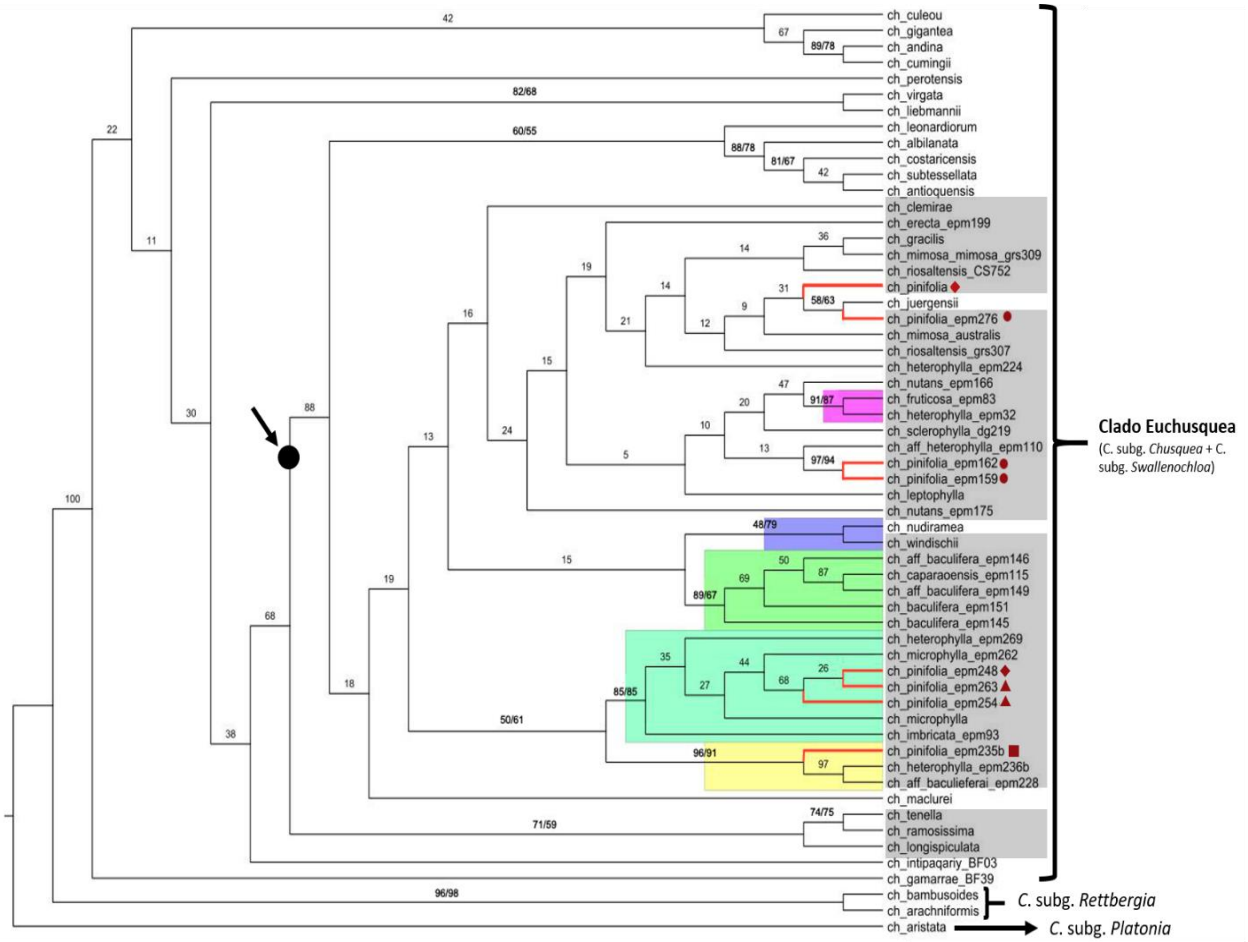

Figura 1: Árvore produzida a partir do consenso das regiões analisadas a partir do método de Máxima Verossimilhança. Os valores localizados à esquerda se referem ao bootstrap em % da Máxima Verossimilhança e os localizados à direita ao bootstrap para a árvore de Máxima Parcimônia. Em destaque (em vermelho), as amostras de *C. pinifolia*. Morfo 1: Losango, Morfo 2: Círculo; Morfo 3: Triângulo, Morfo 4: quadrado. Nos quadros em destaque estão as populações relacionadas geograficamente (Rosa - Parque Estadual da Serra do Brigadeiro; Roxo - Santa Catarina; Verde - Parque Nacional do Caparaó; Azul - Parque Nacional do Itatiaia; Amarelo - Serra dos Órgãos).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que *Chusquea pinifolia* não foi recuperada como uma espécie monofilética, e seus morfotipos, subsidiados pela morfologia e modelagem ecológica de nicho, também não foram sustentados como grupos monofiléticos. Por outro lado, várias relações recuperadas possuem base geográfica, o que tem sido comumente observado no gênero. Tais padrões evolutivos complexos podem estar associados a processos de hibridação entre populações próximas geograficamente, o que precisa ser melhor investigado, demonstrando que ainda é preciso compreender quais metodologias integrativas podem ser informativas para fins taxonômicos e evolutivos nesse gênero.

REFERÊNCIAS

AGAPOW, P.M.; EMONDS, O.R.P.B.; KRANDAL, O.A.; GITTLEMAN, J.L.; MACE, G.M.; MARSHALL, J.C. & PURVIS, A. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *Q Rev Biol* 79(2): 161-179.

CARDOSO, D.; QUEIROZ, L.P.; LIMA, H.C.; SUGANUMA, E.; VAN DEN BERG, C.; LAVIN, M. 2013. A molecular phylogeny of the vataireoid legumes underscores floral evolvability that is general to many early-branching papilionoid lineages. *Am J Bot* 100: 403–421.

CLARK, L.G. 1992. Chusquea sect. Swallenchloa (Poaceae: Bambusoideae) and allies in Brazil. *Brittonia* 44: 387-422.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

DUMINIL, J.; DI MICHELE, M. 2009. Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystematic* 143: 528–542.

FISHER, A.E.; CLARK, L.G.; KELCHNER, S.A. 2014. Molecular Phylogeny Estimation of the Bamboo Genus *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae) and Description of Two New Subgenera. *Syst Biol* 39: 829-844.

MILLER, M. A., PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. 2010. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE). In Creating the *CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees*. pp. 1-8.

PIANISSOLA, E.M.; PARMA, D.F.; SANTOS-GONÇALVES, A.P.; CLARK, L.G. 2018. Two new species of *Chusquea* subg. *Swallenochloa* (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae) from Minas Gerais, Brazil, and complete description of *C. caparaoensis*. *Phytotaxa* 358 (3): 235-250.

RAMBAUT, A. 2012. FigTree v1. 4. University of Edinburgh, Edinburgh, UK. Disponível em: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree

SCHLICK-STEINER, B.C.; STEINER, F.M.; SEIFERT, B., STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R.H. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annu Rev Entomol* 55:421–438.

SELA, I.; ASHKENAZY, H.; KATOH, K.; PUPKO, T. 2015. GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Res* 43 (Web Server issue).

STEMATAKIS, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312–1313.

SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other methods). *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.

VIDAL, K.V.A.; WELKER, C.A.D.; OLIVEIRA, I.L.C.; MOTA, A.C.; OLIVEIRA, R.P.; CLARK, L.G. 2018. A new species of *Chusquea* subg. *Chusquea* (Poaceae—Bambusoideae—Bambuseae) from Minas Gerais, Brazil: morphological evidence and phylogenetic placement within the Euchusquea clade. *Phytotaxa* 365(1):16.

TELLES, L.P.S.; OLIVEIRA, P.R.; PIANISSOLA, E.M.; VIEIRA, J.P.S. 2020. Reavaliação da taxonomia e distribuição de *Chusquea pinifolia* (Nees) Nees (Poaceae, Bambuseae) através de modelagem ecológica de nicho. In: XXIV Seminário de Iniciação Científica da UEFS, Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana.