

ESTUDOS FILOGENÉTICOS EM *CHUSQUEA* KUNTH (POACEAE) COM ÊNFASE EM *C. SUBG. RETTBERGIA*

Kaio Vinicius de Araújo Vidal¹; Reyjane Patrícia de Oliveira²; Aline Costa da Mota³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: kaiovidalbio@hotmail.com

2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rpatricia.oliveira@gmail.com

3. Coorientadora, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Botânica/UEFS, e-mail: alinecostamota@gmail.com

PALAVRAS CHAVE: Filogenia, bambus, DNA plastidial e nuclear

INTRODUÇÃO

Bambus são membros da subfamília Bambusoideae (Poaceae) (GPWG II 2012), claramente monofilética e dividida em bambus lenhosos neotropicais (tribo Bambuseae), bambus herbáceos (tribo Olyreae) e bambus lenhosos temperados (tribo Arundinariae) (Sungkaewet al. 2009). *Chusquea* Kunth é o mais diverso gênero desse grupo, incluído em Bambuseae, e amplamente distribuído nas Américas, ocorrendo do México até Argentina e Chile, incluindo 159 espécies descritas e cerca de ca. 70 novas, das quais ca. 40 são exclusivamente brasileiras (Clark, 1997).

O monofiletismo de *Chusquea* tem sido sustentado por filogenias de múltiplas regiões do DNA plastidial, sendo atualmente subdividido em cinco grupos: *C. subg. Rettbergia*, *C. subg. Chusquea*, *C. subg. Swallenochloa*, além dos grupos informais *Neurolepis* I e II (Fisher et al., 2009). O subgênero *Rettbergia*, apontado como linhagem mais antiga que divergiu nesse gênero, constitui um grupo monofilético (Clark et al., 2007) e atualmente agrupa as espécies: *C. bahiana* L.G. Clark, *C. bambusoides* (Raddi) Hack., *C. bradei* L.G. Clark, *C. capitata* Nees, *C. capituliflora* Trin., *C. oligophylla* Rupr., *C. oxylepis* (Hack.) E. Ekman, *C. pulchella* L.G. Clark, *C. sellowii* Rupr., *C. urelytra* Hack e *C. arachniformis* L.G. Clark & Londoño, a única espécie que não ocorre no Brasil (Fisher et al. 2009).

As relações evolutivas entre essas espécies ainda são pouco conhecidas, assim como as relações dessas com os demais grupos de *Chusquea*. Por isso, a partir de estudos filogenéticos moleculares ampliados em *Chusquea*, através da análise de regiões do DNA nuclear e plastidial, pode-se ampliar a amostragem do grupo nas filogenias existentes e entender melhor os seus relacionamentos, visando também um maior entendimento sobre a taxonomia do grupo.

METODOLOGIA

Esse estudo inclui quase todas as espécies de *Chusquea* subg. *Rettbergia* (Figura 1), conforme definido pelo BPG (2012), com exceção de *C. sellowii*, devido à dificuldade de obtenção de amostras. Para algumas delas foram incluídos múltiplos acessos (*C. bambusoides*, *C. capitata*, *C. capituliflora*, *C. oligophylla* e *C. oxylepis*, oriundas de populações diferentes), sendo que alguns materiais com morfologias distintas foram incluídas no trabalho como aff. (*C. aff. oligophylla*). Também foram utilizadas outras espécies de *Chusquea*, coletadas no Brasil ou em outros países, assim como sequências obtidas do genebank. As espécies de *Chusquea*, incluindo *Neurolepis*, integram o *ingroup* das análises, enquanto os outros gêneros de bambus lenhosos compõem o *outgroup*.



Figura 1: Representantes de *Chusquea* subgênero *Rettbergia*. A. *Chusquea bahiana*, detalhe da gemas no ramo; B. *Chusquea bambusoides*, folhas dos ramos; C. *Chusquea capituliflora*, inflorescência; D. *Chusquea capitata*, folhas dos ramos.

Os materiais utilizados foram coletados ao longo da costa leste do Brasil, com vouchers depositados no herbário HUEFS. As extrações do DNA utilizaram folhas coletadas em sílica gel, seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987). O DNA foi quantificado e as amostras foram depositadas no banco de DNAs do LAMOL/UEFS. A amplificação das regiões selecionadas se deu através de PCR, para três regiões, uma do DNA nuclear (ITS) e duas plastidiais (*trnD-T* e *ndhF*). Os protocolos foram adaptados com base na literatura (Oliveira, 2006), usando termociclador GenAmp PCR System 9700. Utilizou-se, para a amplificações, as enzimas TopTaq™ Master Mix Kit da QIAGEN® e TaqDNA Polimerase (5U/μL), com DNA em diferentes concentrações: para ITS e *ndhF*, concentradas e diluídas 1/50 e para *trnD-T*, concentradas e diluídas 1/50 e 1/25. Os produtos da PCR foram quantificados em gel de agarose 1,0% em tampão SB 1x, utilizando brometo de etídio (0,01g/ml), com bandas visualizadas em transluminador UV.

A purificação dos produtos da PCR utilizaram o protocolo de precipitação com PEG (polietileno glicol), e para algumas amostras, o complexo enzimático ExoStar (Illustras™, GE Healthcare) [fosfatase alcalina de camarão (SAP) e exonuclease I (SAP)], cuja quantificação foi baseada no marcador Low DNA mass ladder. O sequenciamento usou volumes de água e DNA variantes por amostra, em sequenciador ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystem) no LAMOL/UEFS.

As seqüências foram editadas no Staden Package 2.0.0b9 released©, e o alinhamento inicial foi feito no ClustalX 2.1, sendo manualmente reparado no Bioedit v7.1.3©, considerando os critérios de Kelchner (2000). As análises de Máxima Parcimônia (MP) para inferência filogenética foram processadas no programa PAUP* 4.0b10a (Swofford, 2002). A busca heurística foi realizada utilizando-se o algoritmo TBR (*tree-bisectionreconnection*), com 1000 adições. O suporte para cada ramo foi obtido utilizando-se o *non-parametric bootstrapping*, com 2000 pseudo-replicas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As matrizes de dados de ITS, *trnD-T* e *ndhF* totalizaram 4332 caracteres. Desses, 975 pertencem ao ITS, dos quais 705 foram constantes, sendo 78 variáveis, mas não informativos e 76 variáveis e informativos, obtendo-se na busca heurística dessa região 1350 árvores mais parcimoniosas, com 217 passos (CI 0,8387, RI 0,9072). Com *trnD-T* foram obtidos 1275 passos, sendo 942 constantes, 47 variáveis mas não informativos e 70 variáveis e informativos, obtendo-se 616 árvores mais parcimoniosas com 163 passos (CI 0,7791, RI 0,8871). Para *ndhF* foram obtidos 2082 caracteres, dos quais 862 foram constantes, 49 variáveis, mas não informativos e 51 variáveis e informativos, sendo encontradas 72 árvores mais parcimoniosas de 144 passos (CI 0,7361, RI 0,8397).

A partir do conjunto de dados dos genomas plastidiais (*trnD-T* e *ndhF*) foram encontrados quatro clados que representam o subgênero *Rettbergia*, grupo *Neurolepis* I grupo *Neurolepis* II e grupo *Euchusquea* (subgêneros *Chusquea* + *Swallenochloa*), cujos subgêneros não foram monofiléticos, assim como observado por Fisher et al. (2009). As sequências do genoma nuclear (ITS) recuperaram três destes, exceto o grupo *Neurolepis* II (Figura 2), que não teve nenhum representante incluído para essa região. Os dados plastidiais indicam que *Rettbergia* + *Euchusquea* formam um clado, tendo *Neurolepis* I como grupo irmão e *Neurolepis* II sendo o grupo irmão de todos eles (Figura 3), exatamente como indicado por Fisher et al. (2009).

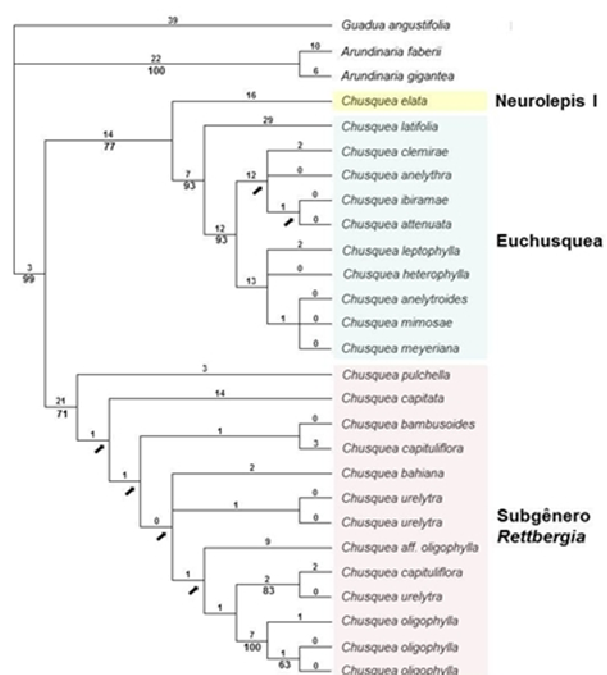


Figura 2: Uma das árvores das mais parcimoniosas de ITS: (números acima dos ramos correspondem aos comprimentos dos ramos, números abaixo dos ramos correspondem aos percentuais de bootstrap e setas pretas indicam os pontos de colapso no consenso *stricto*).

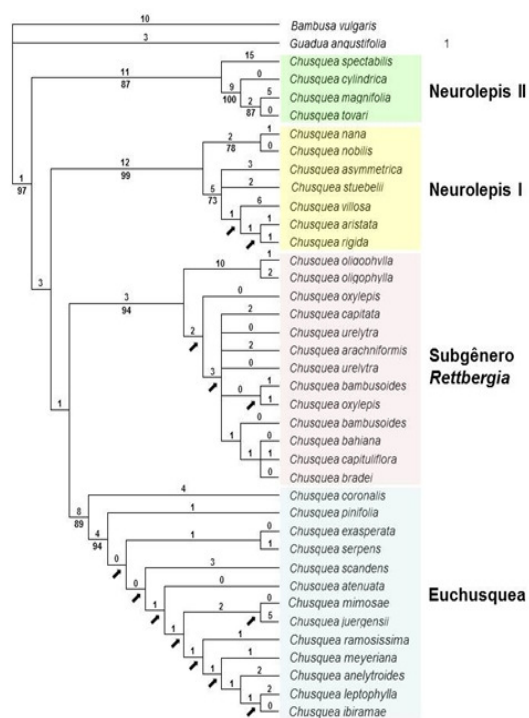


Figura 3: Uma das árvores das mais parcimoniosas de *trnD-T* : (números acima dos ramos correspondem aos comprimentos dos ramos, números abaixo dos ramos correspondem aos percentuais de bootstrap e setas pretas indicam os pontos de colapso no consenso *stricto*).

De acordo com os três conjuntos de dados, o subgênero *Rettbergia* é monofilético, com suporte de bootstrap de 71% no ITS, 94% no *trnD-T* e no 80% *ndhF*. Esses dados concordam com as filogenias recentes no grupo (Clark et al. 2007, Fisher et al. 2009). As análises aqui

apresentadas avaliam pela primeira vez o uso de ITS em filogenias de *Chusquea* e aumentam em muito a representatividade do subgênero *Rettbergia* nas filogenias do gênero.

No entanto, as relações entre as espécies dentro do subgênero *Rettbergia*, de forma geral, não tiveram boa resolução. Porém, para *C. oligophylla*, todos os acessos em todos os conjuntos de dados coalesceram, demonstrando que a espécie é monofilética, mesmo apenas com uso de parcimônia. *C. aff. oligophylla*, assim tratada pela semelhança morfológica com *C. oligophylla*, não apareceu em nenhuma das análises relacionado a esta espécie, sugerindo que esse material pode se tratar de espécie distinta, provavelmente nova, mas o que precisa ser cuidadosamente avaliado através de outros caracteres, como macromorfologia e anatomia.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho se mostraram úteis no entendimento das relações infragenéricas em *Chusquea*, baseada na ampliação da amostragem de espécies nesse gênero, confirmando o monofiletismo de *C. subg. Rettbergia* e do clado *Euchusquea* como grupo irmão deste. Do mesmo modo, foi satisfatória a utilização do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal (ITS), não testado anteriormente no grupo.

A utilização de análises complementares, baseadas em outros pressupostos, como Inferência Bayesiana, podem auxiliar na resolução tanto das relações entre os subgêneros quanto dentro deles. Além disso, a inclusão de novos acessos, como a espécie *C. sellowii* e outras espécies de *Chusquea*, são propostos para a publicação final dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BPG (Bamboo Phylogeny Group) (2012) An updated tribal and subtribal classification for the Bambusoideae (Poaceae). Pp. 3-27 *In* Gielis, J. and G. Potters (eds.), Proceedings of the 9th World Bamboo Congress, 10-12 April 2012, Antwerp, Belgium
- CLARK, L.G. 1997. Diversity, biogeography, and evolution in *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae). In “*The Bamboos*” (G. Chapman, Ed.), pp. 33-44, Academic Press, London.
- CLARK, L.G.; DRANSFIELD, S.; TRIPLETT, J. & SÁNCHEZ-KEN, J.G. 2007. Phylogenetic relationships among the one-flowered, determinate genera of Bambuseae (Poaceae: Bambusoideae). *Aliso* 23: 315-332.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- FISHER, A.E.; TRIPLETT, J.K.; HO, C.; SCHILLER, A.D.; OLTROGGE, K.A.; SCHRODER, E.S.; KELCHNER, S.A. & CLARK, L.G. 2009. Paraphyly in the bamboo subtribe Chusqueinae (Poaceae: Bambusoideae), and a revised infrageneric classification for *Chusquea*. *Systematic Botany* 34: 673-683.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group II). 2012. New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. *New Phytologist* 193: 304-312.
- KELCHNER, S. A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of Missouri Botanical Garden* 87:482-498.
- OLIVEIRA, R.P. 2006. *Estudos taxonômicos, filogenéticos e biossistemáticos em 28 Raddia (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae)*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- SUNGKAEW S., STAPLETON C.M.A, SALAMIN N.&HODIKINSON T.R. (2009) Non monophyly of the woody bamboos (Bambusae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae s.s. *Journal of Plant Research* 122: 95-108.
- SWOFFORD, D. L. 2000. *PAUP**. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4.0 Beta 3a. Sinauer Associated, Sunderland, Massachusetts.