

## FILOGENIA DAS ESPÉCIES DO GRUPO DE *CATTLEYA PURPURATA* (LINDLEY & PAXTON) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE) ATRAVÉS DE SEQUÊNCIAS DE DNA

**Tarciso Maia Santos<sup>1</sup> e Cássio van den Berg<sup>2</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Medicina, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [tarcisomaia1@yahoo.com.br](mailto:tarcisomaia1@yahoo.com.br)
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [vcassio@gmx.de](mailto:vcassio@gmx.de)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cattleya*, filogenia, *rpl32-trnL*.

### INTRODUÇÃO

Inserida na ordem Asparagales, a família Orchidaceae com cerca de 24.500 espécies, é considerada a maior família de plantas (Dressler, 2005). Sua distribuição é cosmopolita, com exceção da região Antártica, entretanto são mais abundante e diversificada em florestas tropicais. No Brasil, as orquídeas estão distribuídas em praticamente todo o território, sendo registradas 2.419 espécies, das quais 1.620 são endêmicas (Barros *et al.*, 2010).

Pertencente à subtribo Laeliinae (Epidendroideae) o gênero *Cattleya* Lindl. se caracteriza por apresentar flores de grande tamanho o que desperta a atenção de taxonomistas e colecionadores (van den Berg, 1996). As espécies do grupo de *Cattleya purpurata* (Lindl. & Paxton) van den Berg são bastante interessantes do ponto de vista botânico por vários aspectos. Algumas espécies que compõe o grupo, oito espécies, são consideradas pelo IBAMA (2008) como ameaçadas de extinção e outras foram enquadradas na categoria com deficiência de dados, ou seja, cujas informações (distribuição geográfica, ameaças/impactos e usos, entre outras) são ainda deficientes, não permitindo enquadrá-las com segurança na condição de ameaçadas. Além disso, ao longo dos últimos anos as espécies sofreram transferência de gênero bem como transferência de seções (Withner, 1990; van den Berg *et al.*, 2000, 2009). Entretanto, os resultados dos estudos baseados em dados morfológicos e sequências ITS não conseguiram esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies do grupo. Dentro desse contexto, buscou-se realizar estudo filogenético a partir de sequências de DNA para o grupo de *C. purpurata* visando à compreensão da filogenia das espécies do grupo.

### MATERIAL E MÉTODOS

O estudo molecular foi conduzido a partir de sequências de DNA. Na análise filogenética foi utilizado um indivíduo de cada espécie. O grupo interno foi composto pelas 15 espécies do grupo *C. purpurata* (Tabela 1). O grupo externo foi composto por algumas espécies do grupo “Unifoliado”: *C. labiata* Lindl. (espécie tipo do gênero), *C. lawrenceana* Rchb.f., *C. lueddemanniana* Rchb.f., *C. luteola* Lindl. e duas espécies representantes do grupo das espécies transferidas do gênero *Sophronitis* para *Cattleya* (as antigas *Laelia* brasileiras): *C. lundii* (Rchb.f. & Warm) van den Berg e *C. pfisteri* (Pabst & Senghas) van den Berg (**Tabela 1**). O DNA de cada amostra foi extraído utilizando uma modificação do protocolo 2 x CTAB de Doyle & Doyle (1987). Inicialmente foram feitas buscas no GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e obtidas as sequências das regiões ITS e *psbA-trnH* de estudos prévios para as espécies em estudo (**Tabela 1**). Foram feitas reações em cadeia da DNA polimerase (PCR) das amostras de DNA e posterior sequenciamento dos produtos da PCR das regiões plastidiais *rpl32-trnL* e *trnL-trnF*. As sequências foram editadas e alinhadas e depois incorporadas a matriz com as regiões (ITS e *psbA-trnH*) baixadas no GenBank. As análises filogenéticas foram feitas de forma individual para cada região e de forma combinada entre todas as quatro regiões. As análises foram conduzidas através dos

critérios de Máxima Parcimônia (MP) no programa PAUP\* (*Phylogenetic analysis using parsimony*) e nos critérios da inferência Bayesiana no programa MrBayes 3.1.2.

**Tabela 1.** Espécies do gênero *Cattleya* analisadas, indicando voucher e número de acesso do GenBank para as sequências oriundas de outros trabalhos.

<b>Espécie</b>	<b>Voucher</b>	<b>ITS</b>	<b><i>psbA-trnH</i></b>
<i>C. alaorii</i> (Brieger & Bicalho) van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> 19179 (ESA)	AF260195.1	-----
<i>C. bicalhoi</i> van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> 15795 (ESA)	AY008633.1	EU140073.1
<i>C. crispa</i> Lindl.	<i>Brieger Coll.</i> 3914 (ESA)	AY008640.1	EU140071.1
<i>C. fidelensis</i> (Pabst) van den Berg	<i>Machado s.n.</i> - C225 - (ESA)	AF260194.1	EU140076.1
<i>C. grandis</i> (Lindl. & Paxton) van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> 19219 (ESA)	AY008637.1	EU140083.1
<i>C. jongheana</i> (Rchb.f.) van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> 31534 (ESA)	AY008632.1	EU140082.1
<i>C. lobata</i> (Lindl.) van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> 3557 (ESA)	AY008639.1	EU140084.1
<i>C. lundii</i> (Rchb.f. & Warm) van den Berg *	<i>Brieger Coll.</i> 30692 (ESA)	AY008645.1	EU140085.1
<i>C. perrinii</i> Lindl.	<i>Brieger Coll.</i> 652 (ESA)	AY008642.1	EU140087.1
<i>C. purpurata</i> (Lindl. & Paxton) van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> (1822)	AY008641.1	EU140091.1
<i>C. tenebrosa</i> (Rolfe) van den Berg	<i>van den Berg</i> C279 ( <i>K spirit</i> )	AY008638.1	EU140094.1
<i>C. xanthina</i> (Lindl.) van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> 6662 (ESA)	AY008643.1	EU140097.1
<i>C. virens</i> (Lindl.) van den Berg	<i>van den Berg</i> C18 (ESA)	AY008636.1	EU140095.1
<i>C. praestans</i> (Linden & Rchb.f.) van den Berg	<i>Machado s.n.</i> - C217 - (ESA)	AY008634.1	EU140089.1
<i>C. pumila</i> (Hook.) van den Berg	<i>Brieger Coll.</i> 7794 (ESA)	AF260196.1	EU140090.1
<i>C. luteola</i> Lindl. *	<i>Brieger Coll.</i> 32187 (ESA)	AY008605.1	EU140045.1
<i>C. lueddemanniana</i> Rchb.f. *	<i>Brieger Coll.</i> 3759 (ESA)	AY008629.1	EU140044.1
<i>C. lawrenceana</i> Rchb.f. *	<i>Brieger Coll.</i> 3802 (ESA)	AF260208.1	EU140043.1
<i>C. labiata</i> Lindl. (Pernambuco) *	<i>Brieger Coll.</i> 5487 (ESA)	AF260214.1	EU140085.1
<i>C. pfisteri</i> (Pabst & Senghas) van den Berg *	<i>van den Berg</i> C226 (ESA)	AY008662.1	EU140088.1
<i>C. sincorana</i> (Schltr.) van den Berg	<i>sem voucher</i> ( <i>Kew 1990-1998</i> )	AY008635.1	EU140093.1

Os \* indicam as espécies que compõem o grupo externo, as demais espécies compõem o grupo de *Cattleya purpurata*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou um total de 83 sequências de DNA. Destas, 41 foram baixadas do GenBank (região ITS e *psbA-trnH*) e 42 foram geradas nesse estudo (*rpl32-trnL* e *trnL-trnF*). A matriz completa (Combinada) com todos os dados das quatro regiões utilizadas totalizou 3.569 caracteres, sendo 3.481 caracteres referentes aos nucleotídeos e 88 caracteres referentes aos *indels*. Dos 3.569 caracteres, 5,65% são variáveis, e 3,22% são

informativos para a parcimônia. A matriz Combinada gerou, na busca heurística, uma (1) árvore mais parcimoniosa com 432 passos, com Índice de Consistência (CI) = 0,77 e Índice de Retenção (RI) = 0,73 (Tabela 2; Fig. 1).

**Tabela 2.** Característica das matrizes e das árvores mais parcimoniosas encontradas nas análises de Máxima Parcimônia individuais e combinadas.

Regiões	Caracteres analisados	Nº de caracteres variáveis	Nº de caracteres inf. p/ parcimônia	Nº de passos na árvore	Nº de árvores	Nº de indels	CI	RI
<i>rpl32-trnL</i>	921	38 (4.03%)	27 (2.86%)	74	9.086	20	0.87	0.87
<i>trnL-trnF</i>	963	23 (2.38%)	11 (1.14%)	37	33	17	0.91	0.88
<i>psbA-trnH</i>	945	18 (1,90%)	5 (0.52%)	26	37.305	17	0.92	0.87
ITS	652	75(11.50%)	52 (7.95%)	185	53	34	0.77	0.78
Plastídio	2727	103 (3.70%)	53 (1.94%)	196	2	-	0.80	0.72
Combinada	3569	202 (5.65%)	115 (3.22%)	432	1	-	0,77	0,73

CI= índice de Consistência e RI= Índice de Retenção.

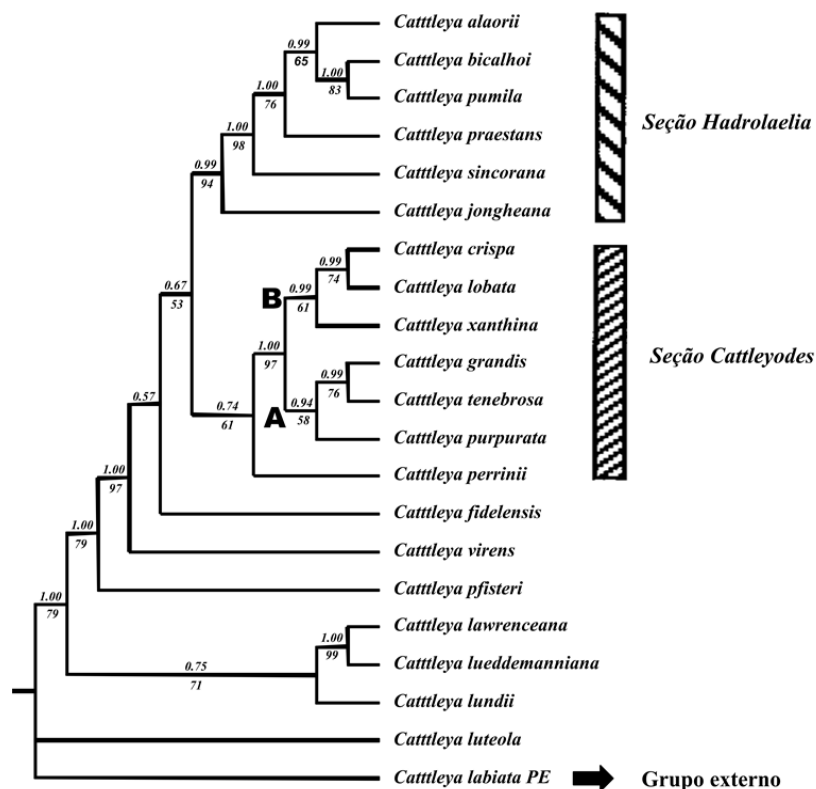
Apesar da incorporação de mais duas regiões plastidiais (*rpl32-trnL* e *trnL-trnF*), os dados nucleares de ITS apresentam maior variação nucleotídica que os três conjuntos de dados plastidiais juntos (*psbA-trnH*, *rpl32-trnL* e *trnL-trnF*). Contudo, os dados de plastídio possibilitaram melhorar as relações filogenéticas inicialmente propostas pelos dados de ITS nos estudos de van den Berg et al. (2000)

De modo geral, as análises de MP e bayesiana individuais produziram árvores com pouca resolução entre os terminais (árvores não apresentadas). A região *rpl32-trnL* apresentou mais proporção de caracteres informativos para a parcimônia (ca. 2,86%) quando comparada com as demais regiões plastidiais (Tabela 2). Entretanto, a região nuclear ITS ainda corresponde a maior parte da variação utilizada nas análises nesse estudo. Assim como no trabalho de van den Berg et al. (2000) a maioria das espécies ficaram agrupadas em duas seções *Cattleyodes* (*C. purpurata*, *C. xanthina*, *C. grandis*, *C. perrinii*, *C. tenebrosa*, *C. crispa* e *C. lobata*) e *Hadrolaelia* (*C. alaorii*, *C. bicalhoi*, *C. praestans*, *C. pumila*, *C. jongheana* e *C. sincorana*), *C. fidelensis* e mais externamente *C. virens* são espécies irmão do clado formado pelas duas seções (*Cattleyodes* e *Hadrolaelia*). Além disso, a maioria dos cladogramas recuperados na análise bayesiana apresentou boa sustentação de *bootstrap* na análise de máxima parcimônia. A seção *Cattleyodes* apresentou internamente dois cladogramas bem estruturados, o clado A formado por *C. grandis*, *C. tenebrosa* e *C. purpurata* (0,94 de PP e 58% de PB) e o clado B formado por *C. crispa*, *C. lobata* e *C. xanthina* (0,99 de PP e 61% de PB). O clado A foi composto por espécies com estruturas florais grades e muito semelhantes morfológicamente. O clado B também foi formado por espécies morfológicamente muito similares como *C. crispa* e *C. lobata*. A seção *Hadrolaelia* é composta por espécies de pequeno porte, geralmente com plantas que não ultrapassam os 30 centímetros de altura. Esse grupo de espécies pequenas foi bem sustentado a partir dos dados de sequência em ambas as análises, como por exemplo, a proximidade entre *C. pumila* e *C. bicalhoi* (1,00 de PP e 83% de PB), a qual sempre foi reconhecida por diversos pesquisadores.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral os dados gerados apresentaram pouca variação quando comparados com os dados nucleares de ITS. Entretanto, os dados, apresentaram boa variação em relação aos dados de plastídeos e possibilitaram uma melhor resolução dentro da filogenia. O grupo de espécies relacionadas à *C. purpurata* ficou nitidamente separado em dois grandes grupos, com exceção de *C. fidelensis* e *C. virens*. Esses dois grupos apresentam espécies de pequeno porte (Seção *Hadrolaelia*) e espécies de maior porte e com flores grandes (Seção

*Cattleyodes*). As relações estabelecidas dentro de cada seção foram na grande maioria bem sustentadas tanto na probabilidade posterior da análise bayesiana quanto no suporte de *bootstrap* da análise de máxima parcimônia. Além disso, as relações estabelecidas pelos dados de sequência de DNA apresentaram relação significativa com as similaridades morfológicas das espécies.



**Figura 1.** Árvore de consenso de maioria das 4.000 árvores resultantes da análise Bayesiana, com modelo de evolução particionado da matriz Combinada (dados das 3 regiões de plastídeo e ITS). Os números acima dos ramos indicam valores de probabilidade posterior da inferência bayesiana (em escala de 0 - 1) e os números abaixo dos ramos valores de suporte de *bootstrap* (%).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, F.DE, VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N., 2010. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>).
- BRASIL. 2008. Ministro de Estado do Meio Ambiente. Instrução Normativa N° 06, de 23 de Setembro de 2008.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L., 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- DRESSLER, R.L., 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26, 155-158.
- VAN DEN BERG, C., HIGGINS, W.E., DRESSLER, R.L., WHITTEN, W.M., SOTO ARENAS, M.A., CULHAM, A., CHASE, M.W., 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. *Ann. Bot.* 104 (3), 417-430.
- WITHNER, C. L. 1990. *The Cattleyas and their relatives. Vol. II. The Cattleyas*. Timber Press, Portland, 153 p.