

MARIANA NEVES MOURA

**HIPÓTESES FILOGENÉTICAS BASEADAS EM CARACTERES MOLECULARES E ESTUDOS DO TAMANHO DO GENOMA EM *Dyckia* Schult. & Schult.f. E *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (BROMELIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M929h  
2014

Moura, Mariana Neves, 1988-  
Hipóteses filogenéticas baseadas em caracteres moleculares  
e estudos do tamanho do genoma em *Dyckia* Schult. & Schult.f.  
*E Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Bromeliaceae) /  
Mariana Neves Moura. – Viçosa, MG, 2014.  
viii, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Karla Suemy Clemente Yotoko.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Plantas - Anatomia. 2. Bromeliaceae. 3. Filogenia.  
4. Genética. 5. Ecologia. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação  
em Ecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 584.85

MARIANA NEVES MOURA

**HIPÓTESES FILOGENÉTICAS BASEADAS EM CARACTERES MOLECULARES E ESTUDOS DO TAMANHO DO GENOMA EM *Dyckia* Schult. & Schult.f. E *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (BROMELIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2014

---

Lyderson Facio Viccini

---

Danon Clemes Cardoso

---

Karla Suemy Clemente Yotoko  
(Orientadora)

*“Todos estes que aí estão  
atravancando o meu caminho,  
eles passarão.  
Eu passarinho!”*

*Mário Quintana*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida, pela saúde e pela família maravilhosa que me deu;

Aos meus pais Antônio Carlos e Marisa por todo o amor e dedicação, por terem sido a peça fundamental para me tornar a pessoa que hoje sou e por todo apoio e esforço para que esta conquista fosse possível. Aos meus irmãos e a toda minha família, que sempre se fizeram presentes e pacientes, e me acolheram em momentos que eu tanto precisava;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade, estrutura e apoio dados através do Programa de Pós Graduação em Ecologia. A todos os professores do programa, por compartilharem conhecimentos e transformarem o ambiente de trabalho em um lugar tão agradável e à Michele, pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar em qualquer situação;

Agradeço em especial à Profa. Karla, pelos ensinamentos, discussões, amizade, companheirismo, solicitude e experiências vividas, que muito me engrandeceram como profissional e pessoa;

Ao CNPq, pela bolsa concedida, e à FAPEMIG, pelo financiamento do projeto;

Aos meus amigos e companheiros de campo Ítalo, Otávio, João Paulo (Puff), Lu, Harvey, Maykon, Danon, José, Lívia, Karla: sem vocês não teria conseguido realizar meu trabalho, não teria passado por momentos tão especiais e nem conhecido tantos lugares;

Aos meus grandes amigos de caminhada que estão comigo desde a graduação e nunca deixaram de ser, em particular Pâm, Léo, Drica, Carol, Déborah, Lu, André, Felipe, Moço, Chicão, Baby, Puff, Van, Lívia, Anderson, e tantos outros que é até difícil citar;

Aos meus amigos de Sete lagoas por fazerem parte da minha história (especialmente Débora, Livinha, Ruca, Gal, Naty, Ana, Dani e Marcelus) e ao trio que de repente transformou minha vida em Viçosa, me mostrou que a cada dia podemos nos renovar e que realmente felicidade é só uma questão de ser: Malu, Naty e Tércia;

À Alice, Paulinha e Monique, amigas e companheiras de república.

Aos funcionários do Herbário, em especial ao Celso;

À Agroflor, pelo apoio e confiança!

Ao meu “estagiário”, João Paulo, um obrigado especial pela imensa boa vontade e paciência;

Aos meus colegas de laboratório, Fábio, Camila, Verônica, Jansen, Naty, Malu, Maykon, Danon, Raphael, Tércia, Leandro, Silvia: obrigada pela ótima convivência e por tantas risadas;

À minha coorientadora, Rafaela Forzza, pela oportunidade desse trabalho e por todo conhecimento compartilhado;

Peço desculpas se esqueci de alguém mas agradeço, de uma maneira geral, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
O Problema de delimitação dos gêneros.....	5
Objetivos.....	6
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>13</b>
INTRODUÇÃO .....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Obtenção dos espécimes e extração do DNA .....	16
Escolha dos marcadores moleculares .....	16
Obtenção das sequências .....	19
Alinhamento e análise filogenética .....	20
RESULTADOS .....	21
DISCUSSÃO .....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>30</b>
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Coleta dos espécimes e extração do DNA .....	33
Medidas dos caracteres morfológicos.....	35
Comparação dos tamanhos de genomas de <i>Dyckia</i> e <i>Encholirium</i> .....	35
Detecção de correlação entre os valores 2C e as medidas de caracteres morfológicos .....	35
RESULTADOS .....	38
DISCUSSÃO .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>47</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos cinco gêneros de Pitcairnioideae na região Neotropical. ....	4
Figura 2. Hipótese filogenética obtida através de caracteres morfológicos .....	15
Figura 3. Mapa dos pontos de coleta.....	17
Figura 4. Hipótese filogenética obtida com o gene <i>matk</i> .....	23
Figura 5. Hipótese filogenética obtida com o gene <i>ndhf</i> .....	24
Figura 6. Histogramas do conteúdo de DNA .....	38
Figura 7. Comparação dos tamanhos de genoma de <i>Dyckia</i> e <i>Encholirium</i> .....	39
Figura 8. Estruturas morfológicas e tamanho do genoma .....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lista das espécies de <i>Dyckia</i> e <i>Encholirium</i> coletadas com data de coleta, localização geográfica e município onde foram coletadas. ....	18
Tabela 2. Lista das espécies de Pitcairnioideae obtidas da coleção do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, com respectivos número de registro (RB), nome do coletor e número de coleta .....	19
Tabela 3. Sequências (5' - 3') dos primers utilizados na amplificação pelo PCR.....	20
Tabela 4. Número de acesso do NCBI às sequências utilizadas na análise filogenética para os genes, <i>matk</i> e <i>ndhf</i> .....	21
Tabela 5. Lista de reagentes necessários para o preparo de 200 ml do tampão LB01.....	34
Tabela 6. Caracteres morfológicos reportados na literatura referentes às espécies utilizadas na análise.....	37
Tabela 7. Espécies incluídas na análise e tamanho do genoma representado no valor de 2C.....	39

## RESUMO

MOURA, Mariana Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Hipóteses filogenéticas baseadas em caracteres moleculares e estudos do tamanho do genoma em *Dyckia* Schult. & Schult.f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Bromeliaceae).** Orientador: Karla Suemy Clemente Yotoko. Coorientadora: Rafaela Campostrini Forzza.

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. contém espécies exclusivas na América do Sul, cujos centros de diversidade encontram-se no sul do Brasil e nas áreas de Cerrado. Das 132 spp. reconhecidas, 129 ocorrem no Brasil e 112 são endêmicas do país. Já *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. apresenta distribuição mais restrita, que se estende do sul do Mato Grosso do Sul ao norte do Piauí, com uma alta diversidade nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais. Hoje são aceitas 27 espécies de *Encholirium*, das quais 13 são endêmicas à porção mineira da cadeia do Espinhaço. Esses dois gêneros ocupam majoritariamente ambientes de clima estacional na diagonal seca, formada pela junção da Caatinga, Cerrado e Chaco. As espécies de ambos os gêneros são rupícolas, adaptadas ao estresse hídrico e possuem morfologia externa característica, com folhas suculentas e fortemente aculeadas. A delimitação dos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* tem sido alvo de controvérsias ao longo do histórico taxonômico, o que se deve à similaridade morfológica entre eles, apesar de existirem caracteres que os distinguem (principalmente a posição do escapo floral). O principal objetivo desse trabalho foi testar o monofiletismo de *Encholirium* através de inferências filogenéticas baseadas em dois genes do cloroplasto. Vinte e duas espécies de *Encholirium* e sete de *Dyckia* foram coletadas nas cercanias de 11 municípios ao longo da Diagonal Seca ou adquiridas da coleção do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. As inferências filogenéticas geradas não sustentam o monofiletismo de *Encholirium*. O segundo objetivo do trabalho foi obter os tamanhos dos genomas das espécies em estudo para tentar encontrar evidências de separação entre os dois gêneros e verificar se existe correlação entre o tamanho do genoma e medidas de estruturas morfológicas. Não foram encontradas diferenças significativas do tamanho dos genomas das espécies classificadas nos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* ( $p = 0,9$ ) e não foram detectadas relações entre medidas de caracteres morfológicos e tamanhos de genoma. Os resultados desse trabalho, somados a outros já publicados, sugerem a necessidade de revisão taxonômica dos gêneros para verificar se trata-se ou não de um único táxon.

## ABSTRACT

MOURA, Mariana Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Phylogenetic hypotheses based on molecular characters and studies of genome size in *Dyckia* Schult. & Schult.f. and *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Bromeliaceae).** Adviser: Karla Suemy Clemente Yotoko. Co-adviser: Rafaela Campostrini Forzza.

*Dyckia* Schult. & Schult. f. has 132 described species and is an exclusive South America genus, whose species occur in diversity centers of southern Brazil and in areas of Brazilian Savanna (Cerrado). 129 species occur in Brazil and 112 are endemic to this country. *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. has 27 species and presents a more restricted distribution, which extends from Southern Mato Grosso do Sul to North Piauí, with a high diversity in Brazilian rocky fields (Campos Rupestres) of the Espinhaço Range (Minas Gerais). Thirteen species of *Encholirium* are endemic to this Range. These two genera occupy mainly seasonal environments along the dry diagonal, formed by the junction of Caatinga, Cerrado and Chaco. Species of both genera are rupicolous adapted to water stress and have characteristic external morphology, with succulent and strongly aculeate leaves. The delimitation of *Dyckia* and *Encholirium* has been controversial over their taxonomic history due to morphological similarities, although there are characteristics that distinguish them (mainly the position of the floral scape). The main objective of this study was to test the monophyly of *Encholirium* through phylogenetic inferences based on two chloroplast genes. Twenty-two species of *Encholirium* and seven of *Dyckia* were collected near of 11 municipalities along the dry diagonal or acquired from the collection of the Botanical Garden of Rio de Janeiro. The phylogenetic inferences generated did not support the monophyly of *Encholirium*. The second aim was to measure the genome sizes of the studied species in order to detect evidence of separation between the two genera and check whether there is a correlation between genome size and measures of morphological structures. No significant differences in the genome sizes of *Dyckia* or *Encholirium* ( $p = 0.9$ ) were found and no relationship between measures of morphology and genome sizes were detected. The results of this study, together with others already published, suggest that a new taxonomic review of the genera is needed to verify whether *Dyckia* and *Encholirium* should be classified into a unique taxon.

## INTRODUÇÃO GERAL

A região conhecida como “diagonal seca” abrange o cinturão de florestas secas na América do Sul, que se caracteriza pela baixa precipitação e alta sazonalidade e se estende por três domínios: Caatinga, Cerrado e Chaco, e ocupa uma posição entre a Amazônia e Mata Atlântica (Prado e Gibbs, 1993). A parte norte do cinturão é dominada pela Caatinga, composta de vegetação xerófila (resistente ao estresse hídrico). A parte central e ao sul da diagonal é coberta pelo Cerrado, o segundo maior bioma brasileiro (> 2 milhões de km<sup>2</sup>), que apresenta, nas regiões de maior altitude (platôs com afloramentos rochosos), os Campos Rupestres (Silva & Bates, 2002). Como essas regiões têm solo raso com baixa capacidade de retenção da água das chuvas, contêm espécies adaptadas ao estresse hídrico, muitas das quais são endêmicas da região (Fiaschi & Pirani, 2009). A porção mais ao Sul da diagonal é ocupada pelo Chaco, que se estende pela Argentina, Bolívia e Paraguai até a parte leste dos Andes (Prado & Gibbs, 1993).

Ao longo da Mata Atlântica, existem remanescentes de vegetação xérica que tiveram uma extensão mais longa durante as glaciações do Pleistoceno (Ab’Saber, 1982; Bigarella & Andrade-Lima, 1982; Prado & Gibbs, 1993; Pennington et al., 2000; Behling et al., 2007), quando um clima mais seco favoreceu a expansão das espécies adaptadas a tal condição no leste do Brasil (Behling, 2002; Ledru et al., 2006; Werneck & Colli, 2006; Behling et al., 2007; Safford, 2007; Caetano et al., 2008; Carnaval & Moritz, 2008). Por outro lado, durante os períodos interglaciais, ocorreram expansões das florestas úmidas e retração da vegetação seca, que permaneceu em topos de morros de elevadas altitudes, onde as condições edafoclimáticas não eram propícias para o desenvolvimento de fisionomias florestais, formando os campos de altitude e os chamados *inselbergs*.

O termo *inselberg* foi introduzido pelo geólogo alemão Friedrich Bornhardt em 1900 para caracterizar montanhas pré-cambrianas, geralmente monolíticas, de gnaiss e granito (Guerra, 2001). São afloramentos rochosos típicos do domínio morfoclimático semi-árido, que emergem abruptamente acima das planícies que os cercam, formando sítios microclimática e edaficamente secos, sustentando uma vegetação altamente especializada (Porembski, 2007). Estes ambientes contêm um grande número de espécies endêmicas e a vegetação saxícola (que se desenvolve sobre fendas e cavidades onde há acúmulo de solo) destes locais é extremamente rica em plantas

perenes resistentes às secas como bromélias, cactos e orquídeas xerófitas e suculentas (Porembski, 2007).

A intensificação do esforço de coleta nos *inselbergs* brasileiros vem trazendo à luz novas espécies de Bromeliaceae, endêmicas desses ambientes peculiares (Leme et al., 2010). Bromeliaceae é a maior das 37 famílias de angiospermas encontradas principalmente ou exclusivamente na Região Neotropical, contendo 58 gêneros e cerca de 3.140 espécies (Stevens, 2013). Aproximadamente 44 gêneros e 1305 espécies ocorrem no Brasil, das quais 1.180 são endêmicas do território brasileiro (Forzza et al., 2013).

Trabalhos sobre a biogeografia histórica de Bromeliaceae mostraram que suas linhagens modernas começaram a divergir há cerca de 19 milhões de anos. O grupo teria surgido no Escudo das Guianas, ao norte da América do Sul, e posteriormente se espalhado centripetamente pelo Novo Mundo (Givnish et al., 2007).

Bromeliaceae sempre foi reconhecida como um táxon natural, o que vem sendo confirmado nas hipóteses filogenéticas construídas a partir de dados morfológicos e macromoleculares (Stevenson & Loconte, 1995; Chase et al., 1995, 2000). No entanto, existem discordâncias a respeito de seu posicionamento dentro das Monocotiledôneas nos diferentes sistemas de classificação (e.g. Dahlgren et al., 1985; Cronquist, 1988) e hoje a família se posiciona como uma linhagem basal na ordem Poales (Chase et al., 2000; Givnish et al., 2006; Graham et al., 2006; APG, 2009). Estudos citogenéticos mostraram que a grande maioria das espécies de Bromeliaceae apresenta  $n=25$ , com uma excessão no gênero *Cryptanthus* ( $n=17$ ) (Benzing, 2000; Cotias-de-Oliveira et al., 2000; Palma-Silva et al., 2004; Bellintani et al., 2005; Ceita et al., 2008). Além disso, alguns estudos mostraram a ocorrência de poliploidia ( $n=50$  ou  $75$ ) nos gêneros *Orthophytum* (Bellintani et al., 2005; Louzada et al., 2010), *Deinacanthon* e *Deuterocohnia* (Gitaí et al., 2005).

Nas últimas décadas, diversos autores vêm questionando a delimitação das categorias infrafamiliares em Bromeliaceae, especialmente das subfamílias e dos gêneros (e.g. Grant, 1992, 1993, 1996; Gouda, 1994; Leme, 1997; Givnish et al., 2004, 2007). Os grupos foram inicialmente estabelecidos com base em características morfológicas como posição do ovário, tipos de frutos e morfologia das sementes, delimitando três subfamílias: Pitcairnioideae,

Tillandsioideae e Bromelioideae (Smith & Downs, 1974, 1977, 1979; Smith & Till, 1998). Porém, os primeiros trabalhos baseados nos princípios da escola filogenética (Gilmartin & Brown, 1987; Terry et al., 1997; Horres et al., 2000) sugeriram a artificialidade da divisão proposta por Smith & Downs (1974).

Givnish et al. (2007, 2011) propuseram uma nova divisão para a família onde os diferentes clados das antigas Pitcairnioideae foram tratados separadamente, e Bromeliaceae passou a ser subdividida em oito subfamílias: Brewcarioideae, Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae.

Com esta nova classificação, Pitcairnioideae passou a abrigar os gêneros *Pitcairnia* L'Hér. (390 spp.), *Dyckia* Schult. & Schult.f. (ca. 160 spp.), *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (27 spp.), *Fosterella* L.B.Sm. (31 spp.) e *Deuterocohnia* Mez (incluindo *Abromeitiella*, 24 spp.) (Forzza et al., 2013). Dentro de Pitcairnioideae *s.s.*, Givnish et al. (2007, 2011) sugeriram um grupo formado exclusivamente pelos gêneros com grande diversificação nos ambientes xéricos da América do Sul, denominado informalmente de “clado xérico” e composto por *Encholirium*, *Dyckia* e *Deuterocohnia* (Figura 1).

Ainda segundo as hipóteses obtidas por Givnish et al. (2007, 2011), os dois gêneros com características morfológicas e anatômicas méxicas (*Pitcairnia* e *Fosterella*) diversificaram-se anteriormente do “clado xérico” (*Dyckia*, *Encholirium* e *Deuterocohnia*). Esses últimos ocupam majoritariamente ambientes de clima estacional na região denominada arco-seco, que é formada pela junção dos três domínios fitogeográficos Caatinga, Cerrado e Chaco (*sensu* Prado & Gibbs 1993). Incluem espécies rupícolas (sobre rocha), adaptadas a ambientes de estresse hídrico, que possuem uma morfologia externa característica, com folhas suculentas e fortemente aculeadas (Benzing, 2000; Givnish et al, 2007, 2011; Smith e Downs, 1974). Já *Fosterella* e *Pitcairnia*, apesar de também ocorrerem em ambientes rochosos, ocupam áreas mais úmidas e sombreadas, e são caracterizadas pela presença de folhas finas e flexíveis (Benzing, 2000; Givnish et al., 2007, 2011; Smith e Downs, 1974).



**Figura 1.** Distribuição dos cinco gêneros de Pitcairnioideae na região Neotropical.

Fonte: Modificado de Givnish et al., 2004.

Dentro desse clado, historicamente houve muita controvérsia quanto à circunscrição de *Encholirium*, uma vez que várias das espécies atualmente classificadas no gênero foram originalmente descritas como *Dyckia* (Mez 1896, Smith 1987, Rauh 1987, Forzza & Wanderley 1998). Este problema permaneceu em aberto até 2001, quando Forzza, delimitou o gênero *Encholirium* com 27 espécies reconhecíveis morfologicamente.

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. contém espécies exclusivas na América do Sul, cujos centros de diversidade encontram-se no sul do Brasil e nas áreas de Cerrado (Forzza, 2001). Das 132 spp. reconhecidas (Luther, 2008; Leme et al., 2010), 129 ocorrem no Brasil e 112 são endêmicas do país (Forzza et al., 2013). Com exceção do Pantanal, há registros de espécies de *Dyckia* em todos os demais domínios fitogeográficos brasileiros (Forzza et al., 2013). Já *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. apresenta distribuição mais restrita, que se estende do

sul do Mato Grosso do Sul ao norte do Piauí. Com exceção de *E. horridum* e *E. gracile*, que foram registradas nos *inselbergs* da Floresta Atlântica, e *E. spectabile*, que tem algumas populações em áreas de transição da Caatinga para a Floresta Atlântica, todas as demais espécies de *Encholirium* são encontradas nos afloramentos rochosos nos domínios da Caatinga e do Cerrado, com uma alta diversidade nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais (Forzza, 2001, 2005).

*Dyckia* apresenta folhas coriáceas; inflorescência axilar; flores monoclinas de coloração dourada, laranja, vinácea ou vermelha; pétalas imbricadas e conatas na base, formando um tubo juntamente com os filetes; sépalas menores que as pétalas, apêndices petalíneos ausentes, estames geralmente inclusos na corola, estilete curto sem ultrapassar as anteras; sementes achatadas com uma ala dorsal (Smith & Downs, 1974; Forzza & Wanderley, 1998). *Encholirium* também apresenta folhas coriáceas, fortemente aculeadas na maioria das espécies; inflorescência terminal com brácteas muito desenvolvidas e semelhantes às folhas; flores monoclinas, com coloração variando do verde ao amarelo ou, mais raramente, róseas ou vináceas; pétalas livres, apêndices petalíneos ausentes e estames e estigmas exsertos, na maior parte das espécies; sementes com superfície celular homogênea e o embrião completamente circundado por uma única ala (Forzza, 2005).

### ***O Problema de delimitação dos gêneros***

De acordo com a hipótese filogenética, baseada em caracteres morfológicos, inferida por Forzza (2001), o gênero *Dyckia* é monofilético (não era monofilético até o reposicionamento de *D. biflora* Mez em *Encholirium biflorum* (Mez) Forzza; Forzza, 2005), suportado por quatro sinapomorfias: escapo axilar, brácteas do escapo diferentes das folhas desde a base, presença de nectários extranupciais nas sépalas e presença de anel pétalo-estamínico.

O histórico da taxonomia do grupo, no entanto, sugere que a delimitação dos gêneros é mais complexa do que parece em uma primeira análise. A primeira referência de *Encholirium* foi apresentada por Spix & Martius (1828). Schultes & Schultes (1830) publicaram vários novos gêneros em Bromeliaceae, dentre eles, *Encholirium*, com apenas uma espécie, *E. spectabile*. Baker (1889) posicionou *Encholirium* como subgênero de *Dyckia*, juntamente com outros gêneros descritos por Schultes & Schultes (1830). Mez (1894) restabeleceu o gênero

*Encholirium*, reconhecendo as espécies *E. spectabile* e *E. glaziovii*. Logo em seguida, Mez (1896) adicionou *E. subsecundum*, anteriormente descrita como *D. subsecundum* por Baker (1889) e em 1908, Ule *E. rupestre* e *E. densiflorum*. Desta forma, até o início do século passado o gênero somava cinco espécies.

Já no século XX, L. B. Smith (Smith, 1955; Smith & Downs, 1974; Smith & Read, 1989) elevou consideravelmente o número de táxons descritos em *Encholirium*. Rauh (1987) propôs para gênero um complexo informal denominado “*longipedicellatum*”. Seguindo o conceito deste autor estariam posicionadas neste complexo *E. reflexum*, *E. biflorum*, *E. heloisae*, *E. vogelii*, *E. scrutator* e *E. pedicellatum*, todas endêmicas da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais. Estas espécies foram descritas, na grande maioria, originalmente em *Dyckia* e, posteriormente, transferidos para *Encholirium* (Mez 1896, Smith 1987, Rauh 1987, Forzza & Wanderley 1998). Outros autores (Mez, 1896; Smith, 1955, 1987; Smith & Downs, 1974; Forzza, 1997; Forzza & Wanderley, 1998) discutiram o posicionamento incerto deste grupo e propuseram que o complexo “*longipedicellatum*” poderia constituir um gênero à parte.

No entanto, a hipótese filogenética apresentada por Forzza (2001) (baseada apenas em dados morfológicos), sugere que *Encholirium* é parafilético e que o complexo *Dyckia-Encholirium* constitui um clado. Vale destacar que nesta hipótese os índices de sustentação dos ramos são extremamente baixos e não fica claro qual seria o melhor posicionamento das espécies hoje mantidas em *Encholirium*. Finalmente, Forzza (2005) publicou a revisão completa do grupo, de modo que hoje são aceitas 27 espécies de *Encholirium* (Forzza et al., 2013), das quais 13 são endêmicas à porção mineira da Cadeia do Espinhaço (Forzza et al., 2012).

### **Objetivos**

Um dos objetivos deste trabalho foi inferir hipóteses filogenéticas baseadas na análise da variação molecular de sequências gênicas de cloroplastos, para testar o monofiletismo de *Encholirium* (capítulo 1). O esforço amostral foi de 22 espécies de *Encholirium* coletadas nas cercanias de 11 municípios ao longo da Diagonal Seca e adquiridas da coleção do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, incluindo representantes dos dois grupos potencialmente distintos. Durante as expedições de coleta, também foram amostradas as espécies de *Dyckia* que co-ocorrem com as populações de *Encholirium*, num total de sete espécies. O segundo objetivo foi

testar hipóteses a respeito das consequências morfológicas de possíveis alterações no tamanho dos genomas (capítulo 2). Para isso, o tamanho do genoma das espécies coletadas foi estimado e dados de descrições das mesmas foram retomados da literatura em busca de medidas de estruturas morfológicas que pudessem ser avaliadas conjuntamente com os tamanhos de genoma. Além dos dados gerados no laboratório, os dados depositados em bancos públicos de dados (o GenBank para as sequências nucleotídicas e o Kew Royal Botanical Gardens, para os tamanhos de genoma) também foram utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. 1982. The paleoclimate and paleoecology of Brazilian Amazonia. *In: Biological diversifications in the tropics* (ed. by G.T. Prance). Columbia University Press, New York, pp. 41–59.
- APG - ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of Linnean Society*, 161(2): 105-121.
- BAKER, J.G. 1889. Handbook of the Bromeliaceae. George Bell and Sons, London. 243p.
- BEHLING, H. 2002. Late Quaternary vegetation and climate dynamics in southeastern Amazonia inferred from Lagoa da Confusão in Tocantins State, northern Brazil. *Amazoniana*, 17: 27–39.
- BEHLING, H.; DUPONT, L.; SAFFORD, H.D. & WEFER, G. 2007. Late Quaternary vegetation and climate dynamics in the Serra da Bocaina, southeastern Brazil. *Quaternary International*, 161: 22–31.
- BELLINTANI, M. C.; ASSIS, J. G.; OLIVEIRA, A. L. P. C. 2005. Chromosomal Evolution of Bromeliaceae. *Cytologia*, 70:129-133.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press. 639p.
- BIGARELLA, J. J. & ANDRADE-LIMA, D. 1982. Paleoenvironmental changes in Brazil. *In: Biological diversifications in the tropics* (ed. by G.T. Prance). Columbia University Press, New York, pp. 27–40.
- CAETANO, S.; PRADO, D.; PENNINGTON, R. T.; BECK, S.; OLIVEIRA-FILHO, A.; SPICHTER, R. & NACIRI, Y. 2008. The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology*, 17: 3147–3159.
- CARNAVAL, A. C. & MORITZ, C. 2008. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35: 1187–1201.
- CEITA, G. O.; ASSIS, J. G. A.; GUEDES, M. L. S.; COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P. C. 2008. Cytogenetics of Brazilian species of Bromeliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158:189–193.
- CHASE, M. W.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; RUDALL, P. J.; FAY, M. F.; HAHN, W. H.; SULLIVAN, S.; JOSEPH, J.; MOLVRAJ, M.; KORES, P. J.; GIVNISH, T. J.; SYSTMA, K. J. & PIRES, J. C. 2000. Higher-level Systematics of the Monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *In: Monocots Systematics and Evolution*. Wilson, K. L. & Morrison, D. A. (eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 3-16.

- CHASE, M. W.; STEVENSON, D. W.; WILKIN, P. & RUDALL, P. J. 1995. Monocot systematics: a combined analysis. In: *Monocotyledons: Systematics and evolution*, Rudall, P. J.; Cribb, P. J.; Cutler, D. F. & Humphries, C. J. (eds.). Royal Botanical Gardens, Kew, pp. 109-137.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A. L. P.; ASSIS, J. G. A.; BELLINTANI, M. C.; ANDRADE, J. C.S.; GUEDE M.L.S. 2000. Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 173-177.
- CRONQUIST, A. 1988. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University, New York. 1262p.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T. & YEO, P. F. 1985. *The families of the monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin. 1ed. 520p.
- FIASCHI, P. & PIRANI, J. R. 2009. Review of plant biogeographic studies in Brazil. *Journal of Systematics and Evolution*, 47: 477-496.
- FORZZA, R.C. 1997. Pitcairnioideae (Bromeliaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- FORZZA, R. C. 2001. Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae–Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 208p.
- FORZZA, R. C. 2005. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 23(1): 1-49.
- FORZZA, R. C.; COSTA, A., SIQUEIRA-FILHO, J. A., MARTINELLI, G., MONTEIRO, R.F., SANTOS-SILVA, F., SARAIVA, D.P, PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R. B. 2013. Bromeliaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000066>). Acesso em 14 de janeiro de 2014.
- FORZZA, R. C.; LEME, E. M. C.; RIBEIRO, O. B. C. 2012. *Encholirium pulchrum* and *Encholirium diamantinum* spp. Nov. (Bromeliaceae) from the Espinhaço Range, Minas Gerais, Brasil. *Nordic Journal of Botany* 30: 153-158.
- FORZZA, R. C. & WANDERLEY, M. G. L. 1998. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Bromeliaceae – Pitcairnioideae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 17: 255-270.
- GILMARTIN, A. J. & BROWN, G. K. 1987. Bromeliales, Related Monocots, and Resolution of Relationships among Bromeliaceae Subfamilies. *Systematic Botany*, 12: 493-500.
- GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A. M. 2005. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 253:65-80.
- GIVNISH, T. J.; BARFUS, M. H. J.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.;

- GONSISKA, P. A. et al. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eightlocus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872–895.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E. & SYTSMA, K. J. 2007. Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23: 3-26
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; EVANS, T. M.; HALL, J. C.; PIRES, J. C.; BERRY, P. E. & SYTSMA, K. J. 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and south-american disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *International Journal of Plant Sciences*, 165: 35-54.
- GIVNISH, T. J.; PIRES, J. C.; GRAHAM, S. W.; MCPHERSON, M. A.; PRINCE, L. M.; PATTERSON, T. B.; RAI, H. S.; ROALSON, E. R.; EVANS, T. M.; HAHN, W. J.; MILLAM, K. C.; MEEROW, A. W.; MOLVRAY, M.; KORES, P.; O'BRIEN, H. E.; KRESS, W. J.; HALL, J.; & SYTSMA, K. J. 2006. Phylogeny of the monocotyledons based on the highly informative plastid gene *ndhF*: evidence for widespread concerted convergence. In: *Monocots: Comparative Biology and Evolution* (excluding Poales), J. T. Columbus, E. A. Friar, J. M. Porter, L. M. Prince, and M. G. Simpson (eds.). Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, CA, Pp. 28-51.
- GOUDA, E. J. 1994. *Distheganthus lateralis* (Bromeliaceae), a new combination for the flora of central French Guiana. *Brittonia*, 46: 134-136.
- GRAHAM, S. W.; ZGURSKI, J. M.; MCPHERSON, M. A.; CHERNIAWSKY, D. M.; SAARELA, J. M.; HORNE, E. S. C.; SMITH, S. Y.; WONG, W. A.; O'BRIEN, H. E.; BIRON, V. L.; PIRES, J. C.; OLMSTEAD, R. G.; CHASE, M. W. & RAI, H. S. 2006. Robust inference of monocot deep phylogeny using an expanded multigene plastid data set. *Aliso*, 22: 3–20.
- GRANT, J. R. 1992. A new combination in *Vriesea* from Costa Rica. *The Journal of the Bromeliad Society*, 42: 14-19.
- GRANT, J. R. 1993. New combinations in *Mezobromelia* and *Racinaea* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Phytologia*, 74: 428-430.
- GRANT, J. R. 1996. New combinations and new taxa in the Bromeliaceae. *Phytologia*, 79: 254-256.
- GUERRA, A. T. 2001. Novo dicionário Geológico – Geomorfológico. 2 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil.
- HORRES, R.; ZIZKA, G.; KAHL, G. & WEISING, K. 2000. Molecular Phylogenetics of Bromeliaceae: Evidence from *trnL* (UAA) Intron Sequences of the Chloroplast Genome. *Plant Biology*, 2: 306-315.
- LEDRU, M. P.; CECCANTINI, G.; GOUVEIA, S. E. M.; LO´PEZ-SAEZ, J. A.; PESSENDA, L. C. R. & RIBEIRO, A. S. 2006. Millennial-scale climatic and vegetation changes in a

- northern Cerrado (Northeast, Brazil) since the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews*, 25: 1110–1126.
- LEME, E. M. C. 1997. Bromélias da Mata Atlântica: Canistrum. *Salamandra*. Rio de Janeiro.
- LEME, E.M.C.; FRAGA, C.N.; KOLLMANN, L.J.C.; BROWN, G.K.; TILL, W.; RIBEIRO, O.B.C.; MACHADO, M.C.; MONTEIRO, F.J.S. & FONTANA, A.P. 2010. Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. *Rodriguésia* 61: 21–67.
- LOUZADA, R. B.; PALMA-SILVA, C.; CORRÊA, A. M.; KALTCHUK-SANTOS, E.; WANDERLEY, M. G. L. 2010. Chromosome number of *Orthophytum* species (Bromeliaceae). *Kew Bulletin*, 65: 53–58.
- LUTHER, H.E. 2008. An alphabetical list of Bromeliad binomials. *The Bromeliad Society International*. Sarasota, Florida, 110p. Mez (1894)
- MEZ, C. 1894. Bromeliaceae. In: Martius, C. F. P.; Eichler, A. W. & Urban, I. (eds). *Flora Brasiliensis*. München, Leipzig, Wien 3(3): 431–462.
- MEZ, C. 1896. Bromeliaceae. In: A. L. P. P. Candolle & A. C. P. Candolle (eds.). *Monographiae Phanerogamarum*. Paris, 9: 1–990.
- PALMA-SILVA, C.; SANTOS D. G.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. 2004. Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (BROMELIACEAE) native to Rio Grande do Sul, Brazil. *American Journal of Botany*, 91: 804–807.
- PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. E. & PENDRY, C. A. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27, 261–273.
- POREMBSKI, S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica*, 30: 579–586.
- PRADO, D. E. & GIBBS, P. E. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80, 902–927.
- RAUH, W. 1987. Bromelienstudien XIX. Trop. Subtrop. *Pflanzenwelt*, 60: 907–1004.
- SAFFORD, H. D. 2007. Brazilian Páramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. *Journal of Biogeography*, 34: 1701–1722.
- SILVA, J. M. C. & BATES, J. M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*, 52: 225–233.
- SMITH, L.B. 1987. New bromeliads, 4: An unusual *Dyckia*. *Journal of Bromeliad Society*, 37: 151–155. SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60:561–588.
- SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*. Hafner Press, New York, New York, USA, 14: 1–662.

- SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*. Hafner Press, New York, New York, USA, 14: 663-1492.
- SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*. Hafner Press, New York, New York, USA, 14: 1493-2141.
- SMITH, L. B. & TILL, W. 1998. Bromeliaceae. In: KUBITZKI K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Volume IV. Flowering Plants–Monocotyledons, Alismatanae e Commelinanae (except Graminae). Springer–Verlag, Berlin Heidelberg, 511p.
- STEVENS, P.F., 2013. Angiosperm Phylogeny. <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>>. Acesso em 16 de janeiro de 2014.
- STEVENSON, D. W. & LOCONTE, H. 1995. Cladistic analysis of monocot families. In: *Monocotyledons: Systematics and evolution*, Rudall, P. J.; Cribb, P. J.; Cutler, D. F. & Humphries, C. J. (eds.), Royal Botanical Gardens, Kew, pp. 543-578.
- TERRY, R. G.; BROWN, G. K. & OLMSTEAD, R. G. 1997. Phylogenetic Relationships in Subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) using *ndhF* sequences. *Systematic Botany*, 22: 333-345.
- WERNECK, F. P. & COLLI, G. R. 2006. The lizard assemblage from Seasonally Dry Tropical Forest enclaves in the Cerrado biome, Brazil, and its association with the Pleistocenic Arc. *Journal of Biogeography*, 33: 1983–1992.
- SCHULTES, J. A. & SCHULTES, J. H. 1830. Bromeliaceae. In J. J. Roemer & J. A. Schultes (eds.). *Systema vegetabilium*. J. G. Cottae. *Stuttgart*, 7: 1193-1287.
- SMITH, L. B. & READ, R. W. 1989. *Encholirium*. *Flora Neotropica Monograph* 14(1) suplement 2. *Bradea*, 5: 291-312.
- SMITH, L. B. 1955. The Bromeliaceae of Brazil. *Smithsonian Miscellaneous collections*, 126: 26.
- SPIX, J. B. & MARTIUS, C. F. P. VON. 1828. *Reise in Brasilien* vol. II. I. J. Lentmer. München.
- ULE, E. 1908. Beitrage zur flora von Bahia – I Bromeliaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 42: 191-199.

## CAPÍTULO I

### Hipótese filogenética molecular do gênero *Encholirium* e suas relações com espécies do gênero *Dyckia* (Bromeliaceae)

Mariana Neves Moura, Karla S. C. Yotoko, Rafaela C. Forzza

**RESUMO** – A delimitação dos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* tem sido alvo de controvérsias ao longo do histórico taxonômico, o que se deve a fatores como a grande semelhança morfológica entre eles, principalmente considerando os caracteres vegetativos; a sobreposição das áreas de ocorrência; e ao fato de que muitas espécies descritas de *Encholirium* foram originalmente descritas como sendo espécies de *Dyckia*. Esse trabalho objetivou testar o monofilismo de *Encholirium* através da análise da variação molecular de duas sequências gênicas de cloroplastos: *matk* e *ndhf*. O esforço amostral foi de 22 espécies de *Encholirium* coletadas nas cercanias de 11 municípios ao longo da Diagonal Seca e adquiridas da coleção do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Durante as expedições de coleta, também foram amostradas as espécies de *Dyckia* que co-ocorrem com as populações de *Encholirium*, num total de sete espécies. As hipóteses moleculares geradas, no entanto, não refletem as diferenças morfológicas que existem entre *Dyckia* e *Encholirium*, o que pode ser explicado por três causas: a primeira, relativa à ausência de resolução filogenética dos genes estudados; a segunda, evolutiva, de que *Dyckia* e *Encholirium* tenham divergido muito recentemente; e a terceira taxonômica, ou seja, que *Dyckia* e *Encholirium* sejam um único táxon ao invés de dois. Os resultados desse trabalho, somados a outras evidências já publicadas, sugerem a necessidade de revisão taxonômica dos gêneros para verificar se a subdivisão dos mesmos reflete dois grupos naturais ou se eles deveriam passar a constituir um único táxon.

**Palavras-chave:** *matk*, *ndhf*, análise Bayesiana, politomia basal.

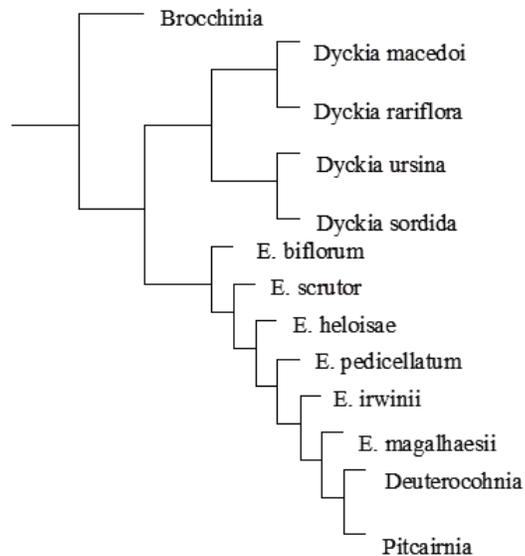
## INTRODUÇÃO

A partir de estudos baseados em caracteres morfológicos, Smith & Dows (1974, 1977, 1979) e Smith & Till (1998) reconheceram três subfamílias em Bromeliaceae (Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae), que mais tarde a partir de inferências filogenéticas foram contestadas (Gilmartin & Brown, 1987; Terry et al., 1997b; Horres et al., 2000). Recentemente, os estudos taxonômicos ganharam o apoio de ferramentas moleculares, que vêm sendo amplamente utilizados para fundamentar a junção e/ou segregação de grupos taxonômicos a partir de critérios de homologia. Baseado nesse tipo de marcador, Givnish et al. (2007, 2011) reestruturou as relações infrafamiliares e propôs a existência de oito subfamílias.

Com esta nova classificação, Pitcairnioideae passou a abrigar os gêneros *Pitcairnia* (390 spp.), *Dyckia* (ca. 160 spp.), *Encholirium* (27 spp.), *Fosterella* (31 spp.) e *Deuterocohnia* (incluindo *Abromeitiella*, 24 spp.) (Forzza et al., 2013). As hipóteses apresentadas por Givnish et al. (2007, 2011) também demonstraram a existência de um clado formado exclusivamente pelos gêneros com grande diversificação nos ambientes xéricos da América do Sul (*Encholirium*, *Dyckia* e *Deuterocohnia*).

Dentro desse grupo, a delimitação dos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* foi alvo de controvérsias ao longo do histórico taxonômico, o que se deve a fatores como: grande semelhança morfológica entre ele, principalmente considerando os caracteres vegetativos; sobreposição das áreas de ocorrência (Figura 1, Introdução Geral) e ao fato de que muitas espécies descritas de *Encholirium* foram originalmente descritas como sendo espécies de *Dyckia* (Mez 1896, Smith 1987, Rauh 1987, Forzza & Wanderley 1998).

Nas décadas de 1980 e 1990 alguns botânicos (Rauh, 1987; Leme, 1995; Gross, 1997; Forzza & Wanderley, 1998) publicaram espécies novas ou propuseram a transferências de espécies de *Dyckia* para *Encholirium*. Em 2001, Forzza construiu uma hipótese filogenética (Figura 2) baseada em caracteres morfológicos e sugeriu que as espécies de *Dyckia* compõem um grupo monofilético (não era monofilético até o reposicionamento de *D. biflora* Mez em *Encholirium biflorum* (Mez) Forzza; Forzza, 2005), o que é suportado por quatro sinapomorfias: escapo axilar, brácteas do escapo diferentes das folhas desde a base, presença de nectários extranupciais nas sépalas e presença de anel pétalo-estamínico.



**Figura 2. Hipótese filogenética obtida através de caracteres morfológicos.** Árvore de consenso estrito, baseada em caracteres morfológicos, mostrando o monofiletismo de *Dyckia* e o parafiletismo *Encholirium* (modificado de Forzza 2001) em Pitcairnioideae.

Porém, segundo essa hipótese filogenética, baseada em dados morfológicos, o gênero *Encholirium* seria parafilético, por conter *Deuterocohnia* e *Pitcairnia*. Vale destacar que nesta hipótese os índices de sustentação dos ramos são extremamente baixos e não fica claro qual seria o melhor posicionamento das espécies hoje mantidas em *Encholirium*. Posteriormente, Forzza (2005) publicou a revisão completa do grupo, de modo que hoje são aceitas 27 espécies de *Encholirium* (Forzza et al., 2013), das quais 13 são endêmicas à porção mineira da cadeia do Espinhaço (Forzza et al., 2012).

Hipóteses filogenéticas mais recentes e baseadas em caracteres moleculares, como as de Givinish et al. (2011, 2013) e Rex et al. (2009), demonstraram o problema na resolução da filogenia de *Dyckia* e *Encholirium*. No entanto, pouco se pôde afirmar sobre a relação entre esses dois gêneros visto que apenas dois terminais de *Encholirium* foram utilizados no primeiro trabalho e um no segundo. Nenhum gene utilizado manifestou sinal filogenético para a relação interespecífica de *Dyckia* e a árvore apresentou uma grande politomia.

O objetivo do presente trabalho foi construir hipóteses filogenéticas baseadas em caracteres moleculares (especificamente dois genes codificadores do DNA do cloroplasto) para testar o monofiletismo de *Encholirium*. O esforço amostral foi de 22 espécies de *Encholirium* e oito de *Dyckia*, coletadas nas cercanias de 11 municípios ao longo da Diagonal Seca e adquiridas

da coleção do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). Espécies de *Pitcairnia* e *Deuterocohnia* foram incluídas na análise como *outgroup* (provenientes da coleção de plantas vivas do JBRJ e da utilização de sequências disponíveis no GenBank).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Obtenção dos espécimes e extração do DNA***

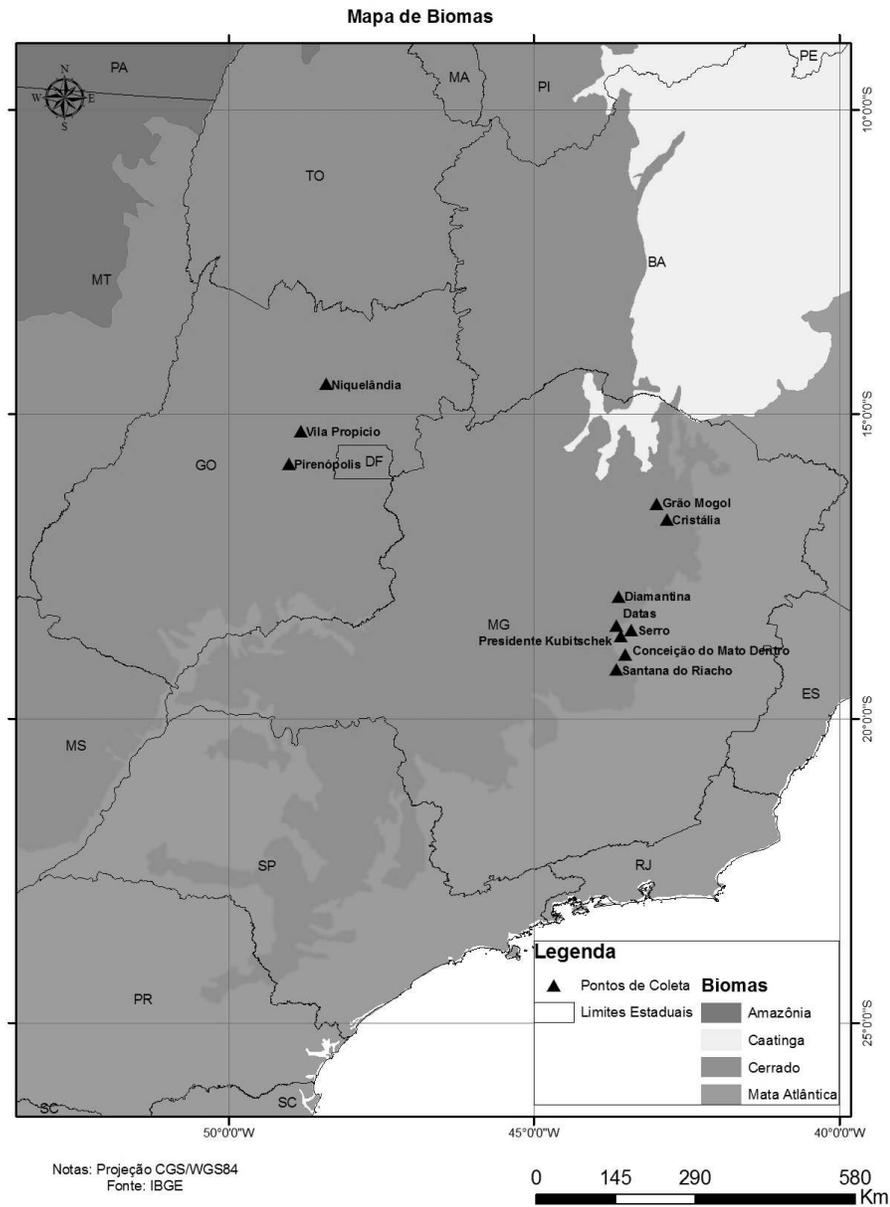
As amostras foram coletadas durante cinco expedições de campo em três localidades no estado de Goiás: Niquelândia, Vila Procópio e Pirenópolis e oito no estado de Minas Gerais: Grão Mogol, Cristália, Diamantina, Datas, Serro, Presidente Kubischek, Conceição do Mato Dentro e Santana do Riacho (Figura 3, Tabela 1). As coletas foram feitas preferencialmente durante o período de floração das espécies e as localidades de coleta foram escolhidas de modo a incluir o maior número possível de espécies do gênero *Encholirium*, além de pontos onde há co-ocorrência dos gêneros *Dyckia* e *Encholirium*. Além disso, foram amostrados os espécimes depositados no Bromeliário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, conforme mostrado na Tabela 2.

A amostragem consistiu na retirada de pequenos fragmentos de tecido foliar jovem, armazenados em sílica gel até a volta ao laboratório, quando foram congeladas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Alguns indivíduos foram coletados inteiros e estão em cultivo no Bromeliário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. De cada espécime em estágio reprodutivo, foi feita uma exsiccata, a ser tombada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, como material testemunho.

### ***Escolha dos marcadores moleculares***

Antes do início do trabalho, realizou-se uma busca na literatura por sequências utilizadas em estudos anteriores contendo *Dyckia* e *Encholirium* cujo resultado sugerisse variação dentro de pelo menos um desses gêneros. Nessa primeira busca, várias sequências nucleares e do DNA do cloroplasto (cpDNA) foram encontradas. Dessas, duas sequências do cpDNA foram selecionadas pelo seu uso tradicional em problemas de relacionamento interespecífico, onde frequentemente revelam alta resolução filogenética, proporcionando a inferência de hipóteses filogenéticas confiáveis (Freitas e Bered, 2003). As duas sequências escolhidas foram o gene

*ndhf*, que codifica para uma das subunidades da enzima NADH desidrogenase do cloroplasto, e o gene *matk*, que codifica para uma maturase.



**Figura 3. Mapa dos pontos de coleta.** Principais localidades amostradas nos estados de Goiás e Minas Gerais (Biomas do Brasil. Fonte: Adaptado de IBGE, 2007). As espécies coletadas por município demarcado estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Lista das espécies de *Dyckia* e *Encholirium* coletadas com data, localização geográfica e Município de coleta.

<b>Identificação</b>	<b>Data</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>Município</b>
<i>Dyckia mello-barretoii</i> L.B.Sm.	02/06/12	19°20'15" S	43°25'31" W	Conceição do Mato dentro, MG
<i>Dyckia saxatilis</i> Mez	20/01/13	18°20'58.4" S	43°33'06.3" W	Diamantina, MG
<i>Dyckia</i> sp.1	14/08/13	16°44'10.0" S	42°58'34.4" W	Cristália, MG
<i>Dyckia</i> sp.2	17/08/13	-	-	Diamantina, MG
<i>Dyckia</i> sp.3	21/01/13	18°40'45.9" S	43°36'08.9" W	Presidente Kubitschek, MG
<i>Dyckia</i> sp.4	25/01/13	14°09'56.4" S	48°22'00.4" W	Niquelândia, GO
<i>Dyckia</i> sp.5	19/04/13	19°21'49.7" S	43°20'01.8" W	Santana do Riacho, MG
<i>Dyckia ursina</i> L.B.Sm.	18/01/13	-	-	Santana do Riacho, MG
<i>Encholirium diamantinum</i> Forzza	20/01/13	18°22'27.4" S	43°32'58.5" W	Diamantina, MG
<i>Encholirium biflorum</i> (Mez) Forzza	21/01/13	18°11'26.8" S	43°37'39.8" W	Diamantina, MG
	08/05/13	18°11'26.8" S	43°37'39.8" W	Diamantina, MG
<i>Encholirium heloisae</i> (L.B.Sm.) Forzza & Wand.	19/04/13	19°15'37.0" S	43°33'06.4" W	Santana do Riacho, MG
<i>Encholirium irwinii</i> L.B.Sm.	14/08/13	16°35'29.1" S	42°54'44.3" W	Grão Mogol, MG
	15/08/13	18°11'26.8" S	43°37'39.8" W	Grão Mogol, MG
<i>Encholirium luxor</i> L.B.Sm. & R.W.Read	24/01/13	-	-	Vila Propício, GO
<i>Encholirium magalhaesii</i> L.B.Sm.	19/01/13	18°18'39" S	43°52'44" W	Diamantina, MG
	21/01/13	18°18'39" S	43°52'44" W	Diamantina, MG
	16/08/13	-	-	Diamantina, MG
	17/08/13	-	-	Diamantina, MG
<i>Encholirium pedicellatum</i> (Mez) Rauh	08/05/13	18°11'26.8" S	43°37'39.8" W	Diamantina, MG
<i>Encholirium pulchrum</i> Forzza et al.	19/04/13	19°21'57.7" S	43°19'58.8" W	Santana do Riacho, MG
<i>Encholirium scrutor</i> (L.B.Sm.) Rauh	21/01/13	-	-	Datas, MG
<i>Encholirium subsecundum</i> (Baker) Mez	02/06/12	19°20'15" S	43°25'31" W	Conceição do Mato dentro, MG
	18/01/13	19°14'51.0"S	43°30'35.9"W	Santana do Riacho, MG
	18/01/13	-	-	Santana do Riacho, MG
	20/01/13	18°21'02.3" S	43°33'07.1" W	Diamantina, MG
	20/01/13	18°22'27.4" S	43°32'58.5" W	Diamantina, MG
	21/01/13	18°39'14.1" S	43°33'26.6" W	Presidente Kubitschek, MG
	18/01/13	19°14'51.0"S	43°30'35.9"W	Santana do Riacho, MG

**Tabela 2.** Lista das espécies de Pitcairnioideae obtidas da coleção do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, com respectivos número de registro (RB), nome do coletor e número de coleta (# coleta).

<b>Espécie</b>	<b>RB</b>	<b>Coletor</b>	<b># Coleta</b>
<i>Dyckia choristaminea</i> Mez	-	Detteke	79
<i>Dyckia distachya</i> Hassl.	-	G. Martinelli	14907
<i>Dyckia pseudococcinea</i> L.B.Sm.	-	P. Ormino	613
<i>Encholirium agavoides</i> Forzza & Zappi	504154	R.C. Forzza	5475
<i>Encholirium ctenophyllum</i> Forzza & Zappi	504157	R.C. Forzza	5455
<i>Encholirium eddestevesii</i> Leme & Forzza	485542	G. Martinelli	16387
<i>Encholirium erectiflorum</i> L.B.Sm.	-	Bromeliario	1577
<i>Encholirium gracile</i> L.B.Sm.	459950	R.C. Forzza	5762
<i>Encholirium horridum</i> L.B.Sm.	462618	R.C. Forzza	5793
<i>Encholirium scrutor</i> (L.B.Sm.) Rauh	58333	R.C. Forzza	4856
<i>Encholirium spectabile</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	331722	G. Martinelli	15058
<i>Encholirium subsecundum</i> (Baker) Mez	-	R.C. Forzza	4890
<i>Pitcairnia barbatostigma</i> Leme & A.P.Fontana	462404	D. P. saraiva	17
<i>Pitcairnia bradei</i> Markgr.	558381	R.C. Forzza	4892
<i>Pitcairnia burchellii</i> Mez	547243	D. P. saraiva	271

### ***Obtenção das sequências***

O DNA total foi extraído a partir de tecidos foliares desidratados em sílica-gel, utilizando o Kit de extração de DNA (Nucleo Spin PLant II – Macherey NAgel). Os fragmentos foram amplificados utilizando a PCR (reação em cadeia da polimerase, Mullis et al., 1986) com volume final de 25 µl e as seguintes concentrações: 0,05 U/µl de GoTaq DNA Polimerase (Promega), dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Tampão de reação 1X, 0,3 µM de cada primer (*forward* e *reverse*) e 2 µl de DNA. As condições do termociclador durante a amplificação foram: 5 min de desnaturação a 95 °C, seguida de 50 seg de *annealing* a 55 - 45 °C e 1 min de extensão a 72 °C. Depois dessa fase de *touch down*, foram feitas mais 40 ciclos com temperatura de *annealing* de 45 °C (50 seg) e 2 min de extensão (72 °C). Os primers específicos das duas regiões de DNA plastidial (cpDNA) escolhidas foram utilizados para a amplificação do material extraído, em termociclador BIOER (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequências (5' - 3') dos primers utilizados na amplificação pelo PCR.

Ref.	Primer	Sequência
Crayn et al. 2004	<i>Matk</i> 909 (F)	GGGGTTGCTAACTCAACGG
	<i>Matk</i> 2 (R)	AACATAATGCATGAAAGGATCC
Terry et al. 1997a	<i>Ndhf</i> 32 (F)	TACCTTTTCTTCCACTTCCAGTT
	<i>Ndhf</i> 745(F)	TGGTTACCTGATGCTATGGAAGG
	<i>Ndhf</i> 1318 (R)	GAAACATATAAAATGCGGTTAATCC
	<i>Ndhf</i> 2110 (R)	CCCCCTATATATTTGATACCTTCTCC

Os produtos de PCR obtidos foram purificados no laboratório com o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) seguindo o protocolo e foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>), localizada na Coreia, de acordo com as especificações sugeridas pelo laboratório (volume mínimo de 20 µl por amostra numa concentração de 100 ng/µl).

As sequências nucleotídicas dos *outgroups* neste estudo foram obtidas a partir do National Center Informação de Biotecnologia - GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), assim como sequências de outras espécies de *Encholirium* e *Dyckia* que também foram encontradas no banco de dados e incluídas na análise.

#### ***Alinhamento e Análise Filogenética***

As sequências foram avaliadas com o auxílio dos programas PhredPhrap (Ewing & Green, 1998, Ewing *et al.*, 1998) e *Consed* (Gordon *et al.*, 1998), que permitem a obtenção de contigs (junção das sequências *Forward* e *Reverse*) para cada espécime e o alinhamento foi feito com o auxílio do programa MEGA 6.5 (Tamura *et al.*, 2011).

As análises filogenéticas foram realizadas através da Inferência Bayesiana (IB) com o programa Mr Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). O programa MrModelTest 2.3 (Nylander 2004) foi utilizado para delimitar quais parâmetros deveriam ser inferidos através da análise bayesiana para cada conjunto de sequências.

Para inferir a árvore através da IB, foram realizadas duas corridas independentes, cada uma com quatro cadeias simultâneas (uma cadeia fria e três quentes), começando com quatro diferentes árvores aleatórias modificadas através de 10<sup>6</sup> gerações de MCMC (Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo) (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As corridas foram monitoradas para

garantir que o desvio padrão entre as cadeias frias (as de maior verossimilhança) não fosse maior que 0,01 no final. Após a corrida, todas as árvores que apresentaram verossimilhança menor que a do platô (árvores geradas durante o “aquecimento da cadeia”) foram retiradas para a construção de uma topologia consenso. A topologia consenso tem a percentagem de vezes que cada ramo apareceu em todas as topologias, e isso é tradicionalmente interpretado como a probabilidade posterior de cada nó da filogenia.

## RESULTADOS

A partir do alinhamento das sequências dos genes *matk* e *ndhf*, foram inferidas duas hipóteses filogenéticas que estão mostradas nas Figura 4 Figura 5.

O alinhamento de 12 sequências do gene *matk* de *Encholirium* e quatro de *Dyckia* resultou em 834 sítios dos quais 17 são variáveis. Uma busca no GenBank pelos outgroups mais apropriados (gêneros próximos) resultou em duas espécies de *Deuterocohnia* (*D. brevispicata* Rauh & L. Hrom. e *D. scapigera* (Rauh & L. Hrom.) M.A. Spencer & L.B. Sm.) e uma espécie de *Pitcairnia* (*P. felicianana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed). No entanto, o alinhamento mostrou que a sequência de *P. felicianana* é duvidosa, pela grande quantidade de sítios polimórficos exclusivos dessa sequência (dados não mostrados). Por esse motivo, utilizamos apenas as sequências de *Deuterocohnia* como outgroups.

O alinhamento de 18 sequências do gene *ndhf* de *Encholirium* e oito de *Dyckia* resultou em 1209 sítios dos quais 32 são variáveis. Foram utilizados como outgroups sequências de *P. burchellii*, *P. bradei* (obtidas no laboratório) e *Pitcairnia felicianana* e *P. carinata* Mez (GenBank).

A Tabela 4 mostra os números de acesso das sequências utilizadas nesse trabalho que foram obtidas do GenBank. Os outgroups utilizados nas duas árvores diferiram em função da disponibilidade de sequências de qualidade desse banco de dados.

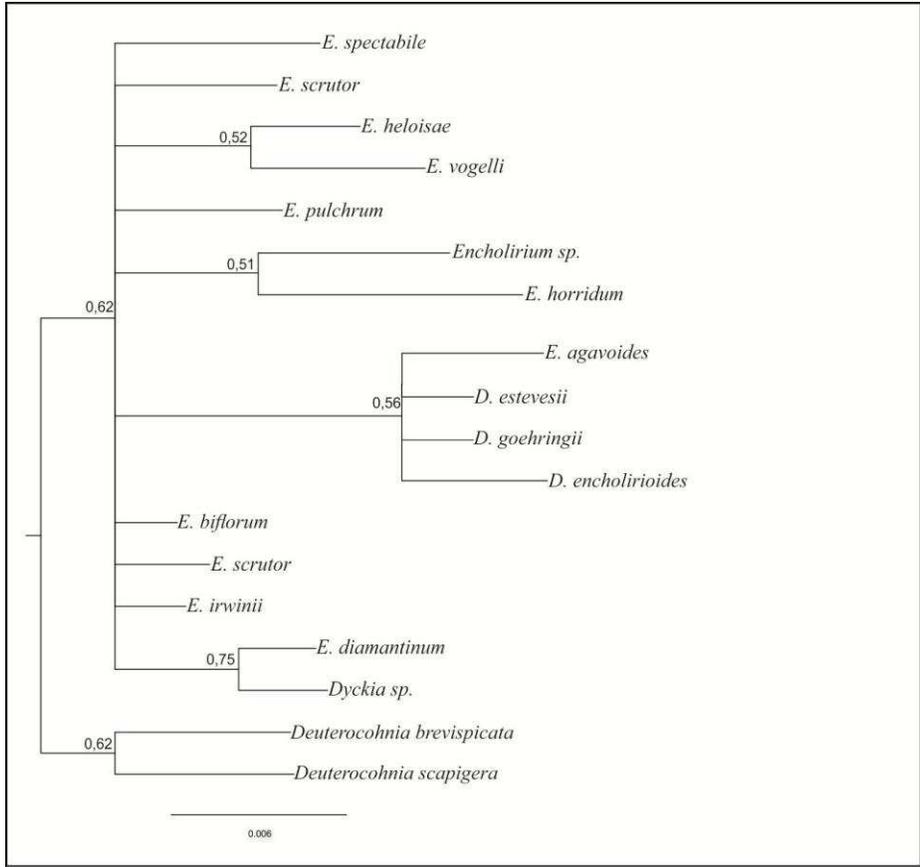
**Tabela 4.** Número de acesso das sequências utilizadas na análise filogenética, no presente trabalho, para os genes *matk* e *ndhf*, obtidos no NCBI.

Sequência	Espécie	# GenBank
<i>Mat k</i>	<i>Deuterocohnia brevispicata</i>	EU681889.1
	<i>Deuterocohnia scapigera</i>	EU681888.1
	<i>Dyckia encholirioides</i>	EU681883.1
	<i>Dyckia estevesii</i>	EU681886.1

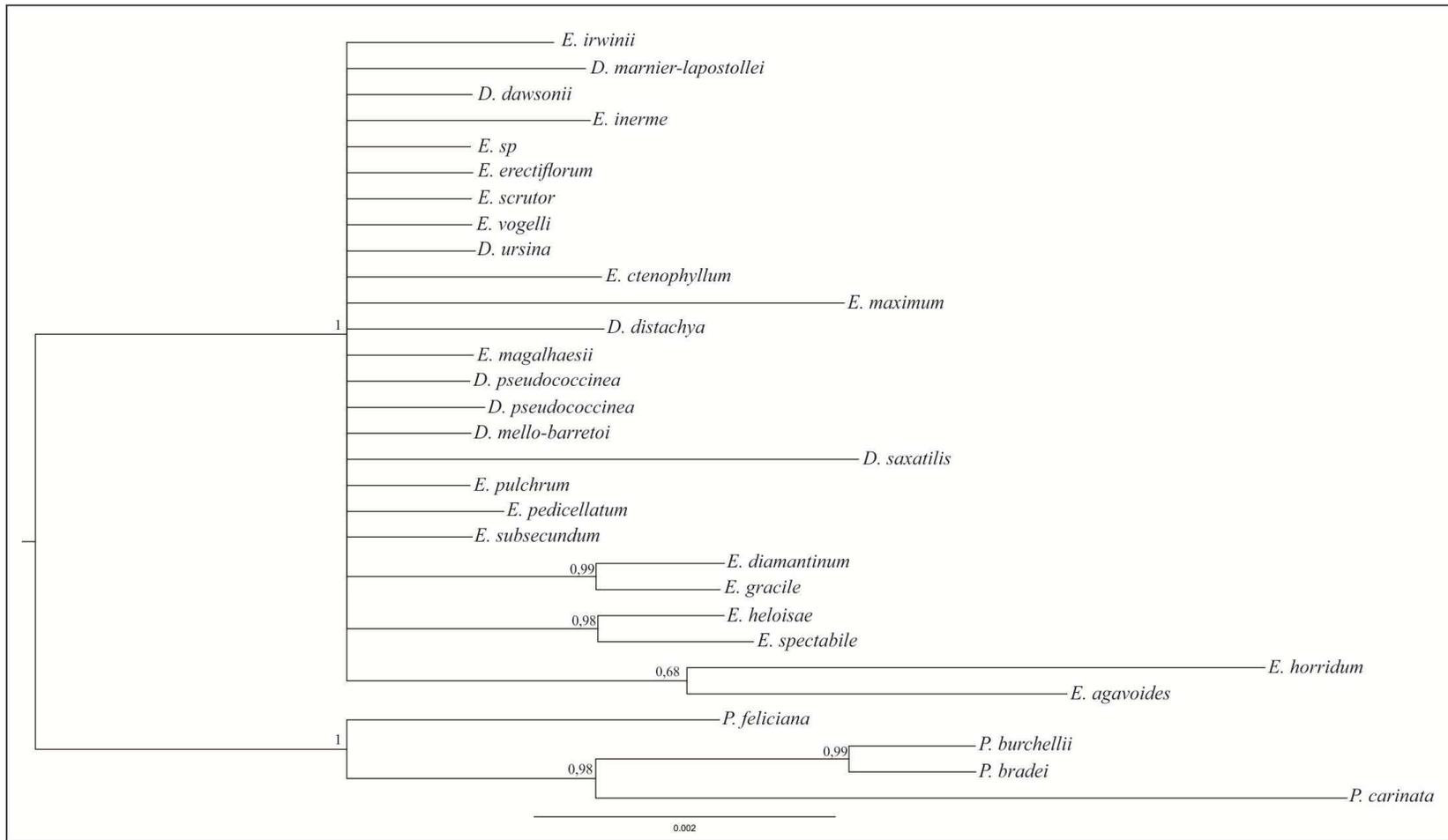
	<i>Dyckia goehringii</i>	EU681884.1
	<i>Encholirium horridum</i>	EU681887.1
<i>Ndfh</i>	<i>Dyckia dawsonii</i>	HQ895744.1
	<i>Dyckia aff. marnier-lapostollei</i>	FJ861137.1
	<i>Encholirium inerme</i>	HQ895747.1
	<i>Encholirium irwinii</i>	HQ895748.1
	<i>Encholirium</i> sp.	L75862.1
	<i>Pitcairnia felicianana</i>	AY438609.1
	<i>Pitcairnia carinata</i>	L75902.1

---

Ambas as hipóteses filogenéticas mostram que, depois da separação dos outgroups, as espécies *Dyckia* e *Encholirium* não formaram grupos monofiléticos. De fato, as árvores se apresentam muito mal resolvidas, com uma grande politomia na base do ramo e poucos ramos contendo pares de espécies agrupados.



**Figura 4. Hipótese filogenética obtida com o gene *matK*.** Árvore obtida pela inferência bayesiana com as sequências do gene *matK* para os gêneros *Dyckia* e *Encholirium*. Os valores dos nós da árvore indicam a probabilidade posterior de cada nó e duas sequências foram utilizadas como *outgroup*: *Deuterocohnia brevispicata* (Gen Bank EU681889.1) e *Deuterocohnia scapigera* (GenBank EU681888.1).



**Figura 5. Hipótese filogenética obtida com o gene *ndhf*.** Árvore obtida pela inferência bayesiana com as sequências do gene *ndhf* para os gêneros *Dyckia* e *Encholirium*. Os valores dos nós da árvore indicam a probabilidade posterior e as sequências das espécies *Pitcairnia felicianae* (GenBank AY438609.1), *P. carinata* (GenBank L75902.1), *P. burchellii* e *P. bradei* foram utilizada como *outgroup*.

## DISCUSSÃO

Em estudos de delimitação de táxons, os pesquisadores tradicionalmente têm se baseado em caracteres morfológicos. Mais recentemente, ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas, o que se justifica pela busca de linhagens evolutivamente distintas. Idealmente, as duas abordagens devem convergir, mas esse nem sempre é o resultado (Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Os motivos pelos quais as abordagens morfológicas são distintas das moleculares são os mais variados, mas em geral estão relacionados a diferentes forças evolutivas atuando nos caracteres moleculares e morfológicos.

Caracteres morfológicos geralmente estão sujeitos à seleção direcional, o que pode resultar em convergências em função do ambiente, além de poderem apresentar plasticidade fenotípica. Já os caracteres moleculares, normalmente utilizados em estudos de reconstrução filogenética, apresentam variação neutra (sequências codificadoras costumam estar sujeitas à seleção purificadora, e sequências não codificadoras teoricamente não são afetadas pela seleção natural). Além disso, os genes utilizados podem não apresentar variação compatível com os táxons em estudo (falta de sinal filogenético) (Frankham, 1995; Hard 1995; Waldman e Andersson, 1998; Futuyma, 1998; Rundle *et al.*, 2000; Reed e Frankham, 2001).

No presente trabalho, as hipóteses moleculares também não refletem as diferenças morfológicas que existem entre *Dyckia* e *Encholirium*, o que pode ter duas causas: a primeira, metodológica, da ausência de resolução filogenética dos genes estudados; e a segunda, evolutiva, de que *Dyckia* e *Encholirium* tenham divergido muito recentemente.

A escolha dos genes, *matk* e *ndhf* (do cloroplasto), foi feita após uma busca na literatura por sequências utilizadas em estudos anteriores, contendo *Dyckia* e *Encholirium*, cujo resultado sugerisse variação dentro de pelo menos um desses gêneros (*e.g.* Givnish *et al.* 2007, 2011). No entanto, genes do cloroplasto evoluem lentamente, o que em geral é compatível com hipóteses filogenéticas interespecíficas, mas pode não ser compatível com a evolução dentro de *Encholirium* e não variar o suficiente para apresentar sinal filogenético da separação deste com *Dyckia*. De fato, Givnish *et al.* (2011), também através de métodos moleculares (sequências nucleares e de cloroplasto), sugeriram que *Encholirium* teria divergido de *Dyckia* há apenas 2,4

milhões de anos. Nesse sentido, trata-se de um grupo muito recente, e sequências que apresentam maior variação podem ser mais apropriadas para testar seu monofiletismo.

Além disso, *Dyckia* e *Encholirium* divergem principalmente pela posição do escapo floral (ver descrição das espécies na Introdução Geral). Conforme estudos recentes sobre o desenvolvimento em plantas, caracteres florais podem surgir ou desaparecer (os genes relacionados à formação destes caracteres podem ser ligados ou desligados) por mutações pontuais em genes de regulação (e.g. Segato et al., 2013). Com isso, mesmo considerando uma diversificação muito recente de *Encholirium* e *Dyckia*, é possível separar morfologicamente os gêneros o que não precisa, necessariamente, ser acompanhado de modificações moleculares nos genes utilizados.

Outra possibilidade, que não pode ser descartada, é a de que não exista a separação entre *Dyckia* e *Encholirium* e que estes dois táxons sejam melhor classificados em apenas um gênero. De fato, os trabalhos de Givnish et al. (2007), utilizando caracteres foliares externos e anatômicos, sugerem a subdivisão de Pitcairnioideae em dois clados monofiléticos: méxico (*Pitcairnia* + *Fosterella*) e xérico (*Deuterocohnia* + *Dyckia* + *Encholirium*). Dentro do clado xérico, eles também apontaram a existência de algumas sinapomorfias em *Deuterocohnia* e outras em *Dyckia* + *Encholirium*, sem contudo especificar sinapomorfias dentro desses dois gêneros. Este mesmo resultado foi encontrado recentemente por Santos-Silva et al. (2013), em um estudo mais refinado, baseado exclusivamente em caracteres anatômicos foliares.

Outro argumento em favor da junção de *Dyckia* e *Encholirium* em um mesmo gênero é a dificuldade de diagnosticá-los no campo na ausência de escapo floral. Nesse sentido, tratar *Dyckia* e *Encholirium* como um gênero só traria consequências positivas em estudos fitogeográficos.

Diante disso, os resultados apresentados no presente trabalho, onde não foi possível distinguir molecularmente os dois gêneros, apresentam mais um argumento para a junção dos mesmos. No entanto, a ausência de evidência não significa evidência de ausência. Com isso, a junção dos gêneros deve levar em conta a ausência de sinapomorfias dentro de cada táxon e estar em acordo com os taxonomistas da área, que devem revisá-los, e, se for o caso, propor a junção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRAYN, D. M.; WINTER, K. & SMITH, J. A. C. 2004. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (10): 3703-3708.
- EWING, B. & GREEN, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*. 8: 186-194.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. & GREEN, P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*. 8: 175-185.
- FORZZA, R. C. 2001. Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae–Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 208p.
- FORZZA, R. C. 2005. Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae – Bromeliaceae. . *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 23(1): 1-49.
- FORZZA, R. C.; COSTA, A., SIQUEIRA-FILHO, J. A., MARTINELLI, G., MONTEIRO, R.F., SANTOS-SILVA, F., SARAIVA, D.P, PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R. B. 2013. Bromeliaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000066>). Acesso em 14 de janeiro de 2014.
- FORZZA, R. C.; LEME, E. M. C.; RIBEIRO, O. B. C. 2012. *Encholirium pulchrum* and *Encholirium diamantinum* spp. Nov. (Bromeliaceae) from the Espinhaço Range, Minas Gerais, Brasil. *Nordic Journal of Botany* 30: 153-158.
- FORZZA, R. C. & WANDERLEY, M. G. L. 1998. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Bromeliaceae – Pitcairnioideae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 17: 255-270.
- FRANKHAM, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29:305–327.
- FREITAS, L.B.; BERED, F.B. 2003. Genética & Evolução Vegetal. Editora da UFRGS, Porto Alegre.
- FUTUYMA, D. J. 1998. Evolutionary biology. 3rd ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- GILMARTIN, A. J. & BROWN, G. K. 1987. Bromeliales, Related Monocots, and Resolution of Relationships among Bromeliaceae Subfamilies. *Systematic Botany*, 12: 493-500.
- GIVNISH, T. J.; BARFUS, M. H. J.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A. et al. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eightlocus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872–895.
- GIVNISH, T. J.; BARFUS, M. H. J.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.;

- GONSISKA, P. A. et al. 2013. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 71: 55–78.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E. & SYTSMA, K. J. 2007. Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23: 3-26
- GORDON, D., ABAJIAN, C., & GREEN, P. 1998. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8(3), 195–202.
- GROSS, E. 1997. Bromelienstudien XXIII. Tropical und Subtropical *Pflanzenwelt*, 95: 7-9.
- HARD, J. H. 1995. A quantitative genetic perspective on the conservation of intraspecific diversity. *American Fisheries Society Symposium*. 17:304–326.
- HORRES, R.; ZIZKA, G.; KAHL, G. & WEISING, K. 2000. Molecular Phylogenetics of Bromeliaceae: Evidence from *trnL* (UAA) Intron Sequences of the Chloroplast Genome. *Plant Biology*, 2: 306-315.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of Phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754{755.
- LEME, E. M. C. 1995. Miscellaneous new species of Brazilian Bromeliaceae. *Selbyana*, 16: 110-122.
- MEZ, C. 1896. Bromeliaceae. In: A. L. P. P. Candolle & A. C. P. Candolle (eds.). *Monographiae Phanerogamarum*. Paris, 9: 1-990.
- MULLIS, K., FALONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN, AND H. ERLICH. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- NYLANDER, A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- RAUH, W. 1987. Bromelienstudien XIX. Trop. Subtrop. *Pflanzenwelt*, 60: 907-1004.
- REED, D.H.; FRANKHAM, R. 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution*, Lawrence, v.55, p. 1095-1103.
- REX, M.; SCHULTE, K.; ZIZKA, G.; PETERS, J.; VÁSQUEZ, R.; IBISCH, P. L. & WEISING, K. 2009. Phylogenetics analysis of *Fosterella* L.B.Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 472-485.
- RONQUIST, F., & HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180.

- RUNDLE, H. D.; NAGEL, L.; BOUGHMAN, J. W.; SCHLUTER, D. 2000. Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. *Science* 287:306–307.
- SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; MONTEIRO, R. F.; PITA, P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. 2013. Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? *Flora* 208: 508-521.
- 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. *Annual Review of Entomology*. 55: 421-438.
- SEGATO, A.L.A; TURCHETTO-ZOLET A.C; AIZZA L.C.B; MONTE-BELLO C.C; DORNELAS M.C; MARGIS, R and FREITAS L.B. 2013. MAEWEST Expression in Flower development of two Petunia Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 13796-13807.
- SMITH, L.B. 1987. New bromeliads, 4: An unusual *Dyckia*. *Journal of Bromeliad Society*, 37: 151-155. SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60:561–588.
- SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*. Hafner Press, New York, New York, USA, 14: 1-662.
- SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*. Hafner Press, New York, New York, USA, 14: 663-1492.
- SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1979. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph*. Hafner Press, New York, New York, USA, 14: 1493-2141.
- SMITH, L. B. & TILL, W. 1998. Bromeliaceae. In: KUBITZKI K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Volume IV. Flowering Plants–Monocotyledons, Alismatanae e Commelinanae (except Graminae). Springer–Verlag, Berlin Heidelberg, 511p.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., G., S., NEI, M. and KUMAR, S. 2011. MEGA 5.0: Molecular Evolutionary Genetics Analyses using Likelihood, Distance and Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution*.
- TERRY, R. G.; BROWN, G. K & OLMSTEAD, R. G. 1997a. Phylogenetic Relationships in Subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) using *ndhF* sequences. *Systematic Botany* 22(2): 333-345.
- TERRY, R. G.; BROWN, G. K & OLMSTEAD, R. G. 1997b. Examination of Subfamilial Phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *American Journal of Botany* 84(5): 664-670.
- WALDMANN, P., & ANDERSSON, S. 1998. Comparison of quantitative genetic variation and allozyme diversity within and between populations of *Scabiosa canescens* and *S. columbaria*. *Heredity* 81:79–86.

## CAPÍTULO II

### Comparação do conteúdo de DNA nuclear entre espécies dos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* (Bromeliaceae)

Mariana Neves Moura, Karla S. C. Yotoko, Rafaela C. Forzza, Lyderson Facio Viccini

**RESUMO** – Em casos de diversificação recente de gêneros, a análise das sequências usualmente utilizadas em estudos filogenéticos pode não ser útil como ferramenta taxonômica porque essas podem não ter tido tempo suficiente para acumular diferenças detectáveis. Por outro lado, modificações bruscas no tamanho do DNA, como aneuploidias ou poliploidias, ocorrem em curtos períodos de tempo (de uma geração para a outra) como consequência de rearranjos ou duplicações cromossômicas, muito comuns em plantas. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi testar hipóteses a respeito das consequências morfológicas de possíveis alterações no tamanho dos genomas de espécies de *Dyckia* e *Encholirium*, que apresentam diferenças morfológicas (principalmente a posição do escapo floral), que no entanto não foram acompanhadas por diferenças moleculares, uma vez que as hipóteses filogenéticas que incluem os dois gêneros obtidas até então não sustentam o monofiletismo de *Dyckia* ou *Encholirium*. Para isso, o tamanho do genoma das espécies coletadas foi estimado e dados de descrições das mesmas foram retomados da literatura em busca de medidas de estruturas morfológicas que pudessem ser avaliadas conjuntamente com os tamanhos de genoma. Além dos dados gerados no laboratório, tamanhos de genoma depositados no Kew Royal Botanical Gardens, também foram utilizados. Não foram encontradas diferenças significativas do tamanho dos genomas das espécies classificadas nos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* ( $p = 0,9$ ). Também, não foi detectada qualquer relação entre medidas de caracteres morfológicos (nesse caso altura da planta, diâmetro da roseta e comprimento do escapo floral) e o tamanho dos genomas das diferentes espécies. Em suma, os valores estimados de tamanho de genoma em *Dyckia* e *Encholirium* não fornecem pistas de uma possível separação entre os gêneros e a tentativa de correlação com medidas morfológicas não fornece evidências de evolução adaptativa no tamanho do genoma.

**Palavras-chave:** Evolução adaptativa x evolução neutra; tamanho do genoma; citometria de fluxo;

## INTRODUÇÃO

A compreensão de padrões e processos envolvidos na especiação nos ambientes tropicais é uma questão amplamente debatida em diversos fóruns, o que pode ajudar a compor as teorias relacionadas à diversificação nos trópicos e a compreender porque estes ambientes abrigam um número tão maior de espécies que ambientes temperados (Hawkins, 2001; Diniz-Filho et al., 2009).

Estudos que envolvem a diversificação de animais utilizam sequências mitocondriais como ferramenta básica, que na maioria dos casos permitem inferências de padrões e processos históricos de diversificação (Moraes et al., 2009; Resende et al., 2010). Em plantas, no entanto, o problema é quase sempre encontrar um marcador adequado, uma vez que as mitocôndrias presentes nas plantas apresentam muito menos variação que as mitocôndrias animais (Freitas e Bered, 2003; Cristiano et al., 2012). Neste sentido, diversos genes nucleares e de cloroplastos vêm sendo utilizados para inferir hipóteses filogenéticas em plantas, mas, em se tratando de táxons tropicais, a variação detectada nestes genes é quase sempre muito menor que a esperada para espécies morfologicamente distintas (Freitas e Bered, 2003).

Conforme demonstrado no Capítulo 1, a delimitação do gênero *Encholirium* ainda é uma questão em aberto: as 27 espécies hoje posicionadas no gênero apresentam caracteres morfológicos (principalmente a posição do escapo floral) que as distinguem das espécies de *Dyckia* (Forzza, 2001), mas que não foram acompanhadas por diferenças moleculares detectáveis pelos genes de cloroplastos (*matk* e *nadhf*) utilizados no trabalho, uma vez que a hipótese filogenética gerada sugere que os gêneros se relacionam através de uma grande politomia. A recente diversificação desses gêneros (Givnish et al. 2011; Palma-Silva et al. 2011; Versieux et al. 2012) ajuda a explicar esses resultados.

Em casos de diversificação recente, a análise das sequências usualmente utilizadas em estudos filogenéticos não é útil para a taxonomia porque podem não ter tido tempo suficiente para acumular diferenças detectáveis. Por outro lado, modificações bruscas no tamanho do DNA, como aneuploidias ou poliploidias, ocorrem em curtos períodos de tempo (de uma geração para a outra) como consequência de rearranjos ou duplicações cromossômicas, muito comuns em plantas, e considerados fatores chave na evolução do genoma de diversas espécies (Soltis &

Soltis, 2009; Campos et al., 2011; Lee et al., 2011; Szadkowsk et al., 2011; Lepers-Andrzejewski et al., 2011; Chester et al., 2012).

O Kew Royal Botanical Gardens disponibiliza uma base de dados (<http://data.kew.org/cvalues/>) contendo grande parte dos tamanhos de genoma já publicados para diferentes espécies de plantas. No entanto, o banco mantém registros de apenas 2,3 % de todas as espécies descritas na família Bromeliaceae. Apesar do número cromossômico variar muito pouco na família (n=25 para a maioria das espécies), o genoma de algumas espécies chega a ser 4,2 vezes maior que o de outras. Dentro da subfamília Pitcairnioideae, *Pitcarnia* apresenta o maior número de espécies no banco (30 spp.), cujos genomas variam de 0,6 pg a 1,44 pg (conteúdo 2C); ou seja, há espécies que contêm o dobro da quantidade de DNA apresentado por outras. Há também duas espécies de *Dyckia*, com 1,58 e 1,6 pg de DNA cada, e uma espécie de *Encholirium*, com 1,74 pg de DNA.

Um dos métodos utilizados para estimar o tamanho do genoma de plantas é a citometria de fluxo (Moscone et al., 2003), que pode ser caracterizada como uma microfotometria fluorescente dinâmica (Greilhuber, 2008), que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, protoplastos, núcleos e cromossomos) em suspensão (Dolezel et al., 2007).

A citometria de fluxo, utilizada para quantificar o DNA, avalia a intensidade relativa de fluorescência dos núcleos isolados, corados com fluorocromo específico, e apresenta os dados em um histograma típico, com um pico maior, relativo aos núcleos na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular, e um pico menor, relativo aos núcleos na fase G<sub>2</sub> (Price et al., 2000; Dolezel e Bartos, 2005). A posição do pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> no histograma da amostra em estudo é comparada com a posição do pico de uma amostra padrão, que teve o conteúdo de DNA estabelecido de forma independente, sendo possível, portanto, determinar o tamanho do genoma nuclear em picogramas (pg) de DNA (Dolezel, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que o tamanho do genoma em algumas espécies correlaciona-se positiva e significativamente com o tamanho de determinadas estruturas das plantas, o que levou os autores a sugerir que o tamanho do genoma seria um caráter adaptativo nessas espécies (e.g. Wakamiya et al., 1993; Chung et al., 1998; Meagher e Costich, 2008). Por

outro lado, outros autores sugeriram que a evolução do genoma seria neutra (Ohno, 1972; Orgel & Crick, 1980; Petrov, 2002; Oliver et al., 2007). Um estudo envolvendo métodos filogenéticos comparativos em 50 espécies de *Passiflora* (subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*) (Yotoko et al., 2011) sugeriu que a evolução do tamanho do genoma pode ser tanto neutra, como foi observado em *Decaloba*, cujas espécies apresentam tamanhos de genoma significativamente menores que *Passiflora*; ou adaptativa, como foi observado no subgênero *Passiflora*, e que existiria um limite mínimo para o tamanho do genoma a partir do qual é possível que ele seja uma característica adaptativa (genomas muito pequenos variam muito pouco em tamanho, uma vez que qualquer alteração em genomas enxutos pode acarretar problemas fenotípicos).

O objetivo do presente trabalho foi estimar os tamanhos de genoma de espécies de *Dyckia* e *Encholirium* para tentar detectar se as diferenças morfológicas entre estes gêneros podem ter surgido em função de alterações bruscas no tamanho do genoma. Além de estimar os valores dos tamanhos de genoma, foram utilizadas as medidas de caracteres morfológicos disponíveis nas descrições das espécies para tentar detectar correlações entre o tamanho do genoma e o tamanho dos caracteres morfológicos em estudo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Coleta dos espécimes e extração do DNA***

Foram coletadas amostras foliares de 46 de indivíduos dos gêneros *Encholirium* e *Dyckia* em cultivo no bromeliário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. O material foi embebido em algodão úmido e mantido sob baixas temperaturas e transportado para o Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde foi analisado. Para a medição do tamanho do genoma, é essencial que as amostras estejam frescas (células vivas) visto que o fluorocromo intercalante de DNA (Iodeto de Propídeo) é sensível ao estado de condensação da cromatina e, caso as amostras estejam fixadas, pode haver ruído na análise (Dolezel e Bartos, 2005).

A extração dos núcleos das espécies alvo e do padrão interno *Pisum sativum* (ervilha) foi realizada simultaneamente de acordo com as recomendações de Galbraith et al. (1983). Aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tecido foliar das amostras alvo e do tecido foliar do padrão interno de referência foram macerados com auxílio de uma lâmina cortante em uma placa de Petri

contendo 1 ml do tampão LB01 (Tabela 5) gelado, para liberação dos núcleos celulares (Dolezel et al. 1989).

**Tabela 5.** Lista de reagentes necessários para o preparo de 200 ml do tampão LB01.

Reagente	Quantidade
TRIS BASE	0,3634 g
Na <sub>2</sub> EDTA	0,1489 g
Spermina	0,0348 g
KCl	1,193 g
NaCl	0,2338 g
β-Mercaptoetanol	220 µl
Triton X-100	200 µl

O tecido macerado foi aspirado com uma pipeta plástica coberta por duas camadas de gaze para filtrar fragmentos grandes e posteriormente filtrado em uma malha de 50 µm e inserido em um tubo de poliestireno, próprio para ser utilizado no citômetro. Os núcleos foram posteriormente tratados com 5,0 µl de RNase (100 µg/ml) (para eliminar o RNA e garantir a quantificação exclusiva do DNA nuclear) e corados com 50 µl de uma solução de 1,0 mg/ml de iodeto de propídeo, um agente intercalante do DNA. As amostras foram armazenadas no escuro e analisadas em até uma hora após preparo.

De cada amostra, 10.000 núcleos foram avaliados quanto ao conteúdo de DNA, inferido através da análise da intensidade relativa da fluorescência dos núcleos corados com o iodeto de propídeo quando excitados por uma fonte de laser de 488 nm. As medidas de fluorescência dos 10.000 núcleos foram plotadas em um histograma que tem como eixo X uma escala arbitrária e como eixo Y a quantidade de núcleos que resultaram exatamente na mesma intensidade de fluorescência. Como as medidas podem variar de acordo com a fase do ciclo celular de cada núcleo e outros fatores estocásticos (como a interferência de metabólitos secundários), os resultados têm de ser avaliados pelos picos mais altos, tanto do padrão quanto do espécime em estudo, que não devem apresentar coeficiente de variação acima de 5,0 % (caso em que devem ser rejeitados, seguindo as recomendações de Praça-Fontes et al., 2011).

No presente estudo, assim como no de Madail (2011), foi utilizado como padrão interno a ervilha (*Pisum sativum*), que possui um conteúdo de 2 C de DNA de 9,09 pg (Dolezel et al., 1998).

O tamanho do genoma de cada amostra foi calculado utilizando o tamanho médio do genoma (2C) de *P. sativum* e os valores obtidos nos histogramas de acordo com a seguinte equação (adaptada de Dolezel e Bartos, 2005) utilizando até três amostras por espécie:

$$2C_{(amostra)} = \frac{\text{valor\_observado\_no\_canal\_do\_pico\_}G_0 / G_{L(amostra)}}{\text{Valor\_observado\_no\_canal\_do\_pico\_}G_0 / G_{L(pad\tilde{a}o)}} \cdot 2C(\text{padr\tilde{a}o})$$

A análise foi realizada com o citômetro de fluxo FacsCalibur (Becton Dickinson), equipado com uma fonte de laser (488 nm), e os histogramas foram gerados pelo software Cell Quest. A análise dos histogramas foi feita por meio do software WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>) e aqueles com coeficiente de variação (CV) acima de 5% foram descartados.

### ***Medidas dos caracteres morfológicos***

Os caracteres morfológicos utilizados na análise de correlação com o tamanho do genoma foram aqueles considerados mais úteis para diferenciação das espécies. Portanto, medidas da altura das plantas, diâmetro da roseta e comprimento do escapo floral foram obtidos da descrição das espécies na literatura. Todos os dados utilizados e os respectivos autores encontram-se na Tabela 5.

### ***Comparação dos tamanhos de genomas de *Dyckia* e *Encholirium****

Para verificar se existe diferença significativa entre as médias dos valores dos tamanhos de genoma das espécies de *Dyckia* e de *Encholirium*, os resultados obtidos foram primeiramente testados quanto à normalidade e posteriormente avaliados com um teste de comparação de médias (paramétrico ou não paramétrico de acordo com o teste de normalidade). As análises foram feitas utilizando o software R (R Development Core Team, 2011).

### ***Detecção de correlação entre os valores 2C e as medidas de caracteres morfológicos***

A comparação dos valores médios do tamanho do genoma (média de 2C) com as medidas dos caracteres morfológicos obtidas na literatura foi realizada através de uma abordagem visual. Isso foi feito porque todos os dados de morfologia são apresentados na forma de amplitude nas descrições das espécies (valores máximos e mínimos), de modo que o *n* amostral e os valores de

média são desconhecidos, o que impossibilitou o uso de análises estatísticas. A figura foi elaborada com o auxílio do software *CorelDRAW X6*.

**Tabela 6.** Caracteres morfológicos reportados na literatura referentes às espécies utilizadas na análise.

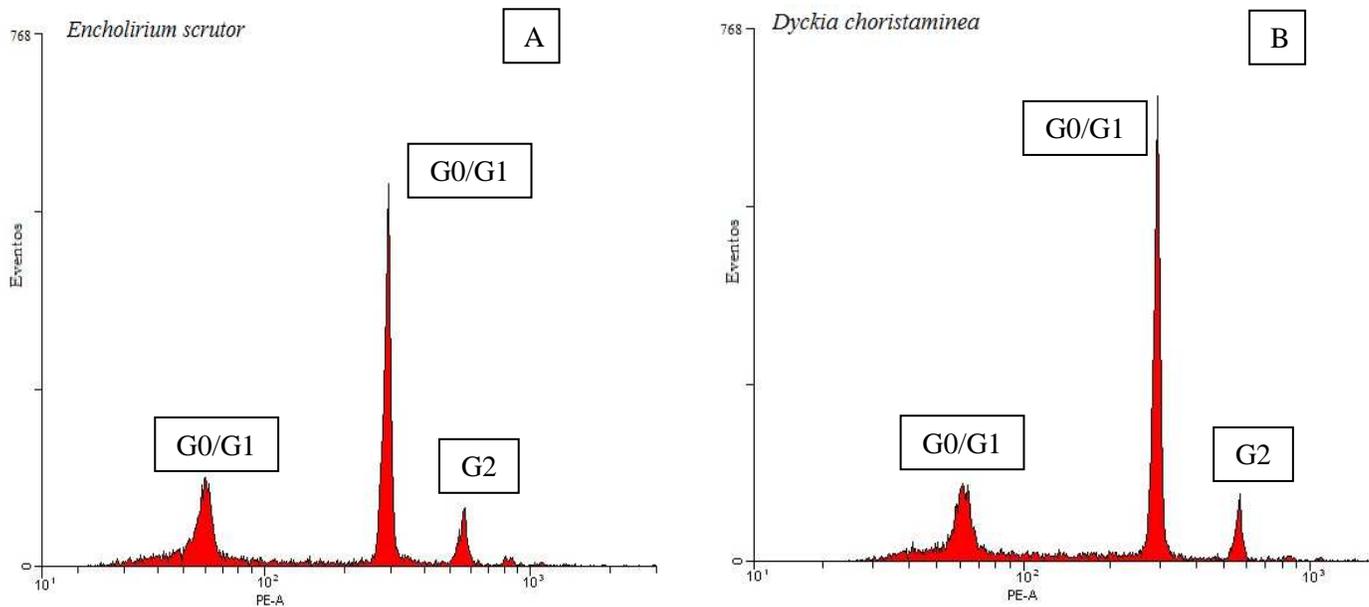
<b>Espécie</b>	<b>Altura da planta</b>	<b>Roseta</b>	<b>Escapo Floral</b>	<b>Referência</b>
<i>Dyckia ursina</i> L.B.Sm.	40 - 100 cm	30 - 80 cm	40 - 70 cm	Forzza & Wanderley, 1998
<i>Dyckia saxatilis</i> Mez	30 - 85 cm	15 - 30 cm	12 - 50 cm	Forzza & Wanderley, 1998
<i>Encholirium agavoides</i> Forzza & Zappi	30 - 44 cm	6 - 10 cm	12 - 22 cm	Forzza e Zappi, 2011
<i>Encholirium biflorum</i> (Mez) Forzza	11 - 32 cm	4 - 11 cm	0,7 - 22 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium ctenophyllum</i> Forzza & Zappi	50 - 70 cm	15 - 28 cm	35 - 45 cm	Forzza e Zappi, 2011
<i>Encholirium diamantinum</i> Forzza	80 - 130 cm	15 - 30 cm	45-62 cm	Forzza et al. 2012
<i>Encholirium gracile</i> L.B.Sm.	80 - 100 cm	30 - 40 cm	33 - 72 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium horridum</i> L.B.Sm.	180 - 210 cm	60 - 100 cm	40 - 80 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium heloisae</i> (L.B.Sm.) Forzza & Wand	25 - 50 cm	6 - 18 cm	13 - 30 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium irwinii</i> L.B.Sm.	80 - 100 cm	20 -30 cm	43 - 72 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium luxor</i> L.B.Sm. & Read	160 - 220 cm	80 - 110 cm	70 - 120 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium maximum</i> Forzza & Leme	150 - 180 cm	70 - 120 cm	60 - 130 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium magalhaesii</i> L.B.Sm.	45 - 100 cm	8 - 10 cm	28 - 70 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium pedicellatum</i> (Mez) Rauh	65 - 70 cm	9 - 16 cm	27 - 40 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium pulchrum</i> Forzza, Leme & O.B.C. Ribeiro	70 - 78 cm	Até 40 cm	30 - 35 cm	Forzza et al. 2012
<i>Encholirium reflexum</i> Forzza & Wand	60 - 100 cm	15 - 30 cm	45 - 62 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium scrutor</i> (L.B.Sm.) Rauh	19 - 56 cm	4 - 8 cm	12 - 28 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium spectabile</i> Mart. ex Schult. & Schult. f.	120 - 150 cm	50 - 110 cm	80 - 150 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium subsecundum</i> (Baker) Mez	150 - 200 cm	60 - 100 cm	70 - 150 cm	Forzza, 2005
<i>Encholirium vogelii</i> Rauh	140 - 150 cm	80 - 100 cm	70 - 80 cm	Forzza, 2005

## RESULTADOS

Foram amostrados 46 indivíduos correspondentes a 23 espécies, cinco pertencentes ao gênero *Dyckia* e 18 a *Encholirium*. Além disso, foram incluídos dados do tamanho do genoma de duas espécies de *Dyckia* (*D. estevesii* e *D. floribunda*) que estão disponíveis na base de dados do Kew Royal Botanical Gardens (<http://data.kew.org/cvalues/>) (Tabela 7).

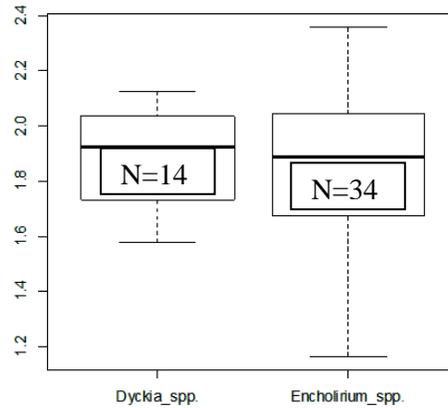
Os histogramas da quantidade de DNA nuclear mostram apenas os picos correspondentes à intensidade de fluorescência dos núcleos em G0/G1 (quantidade de DNA 2C) nas espécies alvo e dos núcleos G0/G1 e G2 do padrão interno (*P. sativum*) (

Figura 6). Os coeficientes de variação (CV) da fase G0/G1, utilizada para o cálculo do tamanho do genoma, foram menores que 5% (valor considerado adequado para procedimentos de citometria de fluxo em plantas) (Praça-Fontes et al., 2011).



**Figura 6. Histogramas do conteúdo de DNA.** Histogramas da intensidade de fluorescência obtidos em (A) *Encholirium scrutor* e (B) *Dyckia choristaminea* (pico mais à esquerda em ambos os gráficos) a partir das suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo em citômetro FACS Calibur. O pico mais à esquerda corresponde aos núcleos G0/G1 da espécie em estudo e os outros dois picos em cada gráfico correspondem aos picos G0/G1 e G2 de *Pisum sativum*, utilizado como padrão interno. O eixo X corresponde a uma escala arbitrária da intensidade de fluorescência (proporcional ao tamanho do genoma) e o eixo Y representa a frequência de cada intensidade de fluorescência.

Os valores médios do tamanho de genoma (Tabela 7) não apresentaram normalidade, portanto foi feito o teste não paramétrico de Wilcoxon, que revelou que não há diferenças significativas ( $p = 0,9$ ) no tamanho do genoma desses gêneros (Figura 7).



**Figura 7. Comparação dos tamanhos de genoma de *Dyckia* e *Encholirium*.** Comparação dos valores médios dos tamanhos de genoma de *Dyckia* e *Encholirium*, através do teste de Wilcoxon ( $p = 0,9$ ). O eixo Y representa os valores de tamanho de genoma.

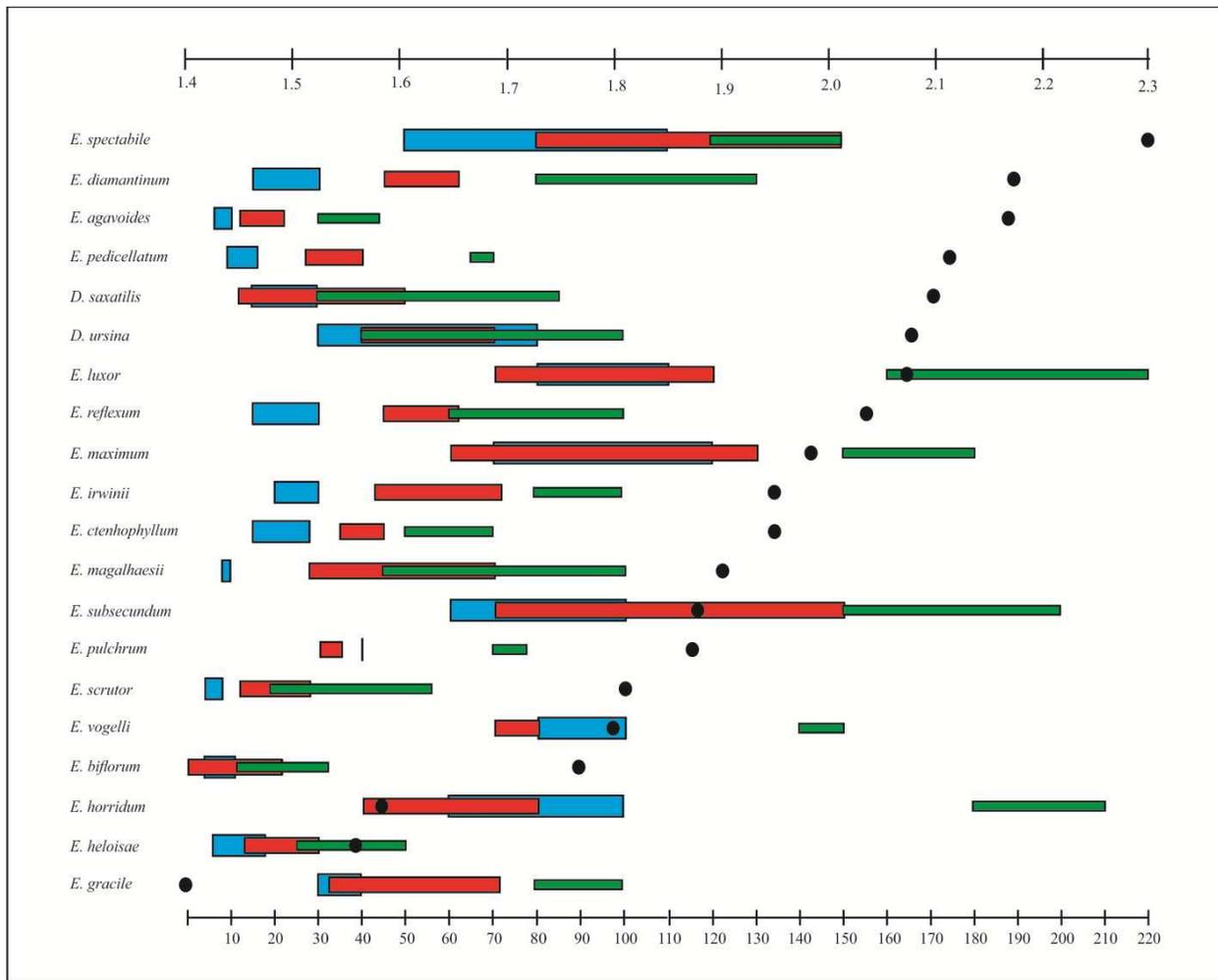
**Tabela 7.** Conteúdo de DNA (2C) de espécies de *Dyckia* e *Encholirium*, obtidas da análise em Citômetro de Fluxo.

Indivíduos	2C (pg)	Média
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh*	1,6	<b>1,6</b>
<i>Dyckia floribunda</i> Griseb.*	1,58	<b>1,58</b>
<i>Dyckia choristaminea</i> Mez	1,91	<b>1,77</b>
	1,65	
	1,74	
<i>Dyckia distachya</i> Hassl.	1,73	<b>1,86</b>
	1,94	
	1,91	
<i>Dyckia pseudococcinea</i> L.B.Sm.	2,06	<b>2,01</b>
	1,95	
	2,00	
<i>Dyckia saxatilis</i> Mez	2,10	<b>2,10</b>
<i>Dyckia ursina</i> L.B.Sm.	2,04	<b>2,08</b>
	2,12	
<i>Encholirium agavoides</i> Forzza & Zappi	2,09	<b>2,17</b>
	2,07	
	2,36	

<b>Indivíduos</b>	<b>2C (pg)</b>	<b>Média</b>
<i>Encholirium biflorum</i> (Mez) Forzza	1,94 1,66	<b>1,77</b>
	1,72	
<i>Encholirium ctenophyllum</i> Forzza & Zappi	1,96	<b>1,96</b>
<i>Encholirium diamantinum</i> Forzza	2,17	<b>2,17</b>
<i>Encholirium gracile</i> L.B.Sm.	1,17 1,64	<b>1,40</b>
<i>Encholirium horridum</i> L.B.Sm.	1,55 1,67	<b>1,59</b>
	1,55	
<i>Encholirium heloisae</i> (L.B.Sm.) Forzza & Wand	1,55 1,31	<b>1,56</b>
	1,81	
<i>Encholirium irwinii</i> L.B.Sm.	1,95	<b>1,95</b>
<i>Encholirium luxor</i> L.B.Sm. & Read	2,18 2,17	<b>2,17</b>
<i>Encholirium maximum</i> Forzza & Leme	1,97	<b>1,97</b>
<i>Encholirium magalhaesii</i> L.B.Sm.	1,84 1,96	<b>1,90</b>
<i>Encholirium pedicellatum</i> (Mez) Rauh	2,12	<b>2,12</b>
<i>Encholirium pulchrum</i> Forzza et al.	2,01 1,67	<b>1,89</b>
	1,98	
<i>Encholirium reflexum</i> Forzza & Wand	2,04	<b>2,04</b>
<i>Encholirium scrutor</i> (L.B.Sm.) Rauh	1,86 1,87	<b>1,81</b>
	1,71	
<i>Encholirium spectabile</i> Mart. ex Schult. & Schult. f.	2,30	<b>2,30</b>
<i>Encholirium subsecundum</i> (Baker) Mez	1,84 1,91	<b>1,88</b>
<i>Encholirium vogelii</i> Rauh	1,81	<b>1,81</b>

\* Valores disponíveis no Kew Royal Botanical Gardens database

A Figura 8 mostra a análise visual construída para avaliar alterações nas medidas de estruturas morfológicas em função do tamanho do genoma das diferentes espécies estudadas. Nessa figura fica claro que não há qualquer correlação entre esses parâmetros e que, portanto, não é possível estabelecer relações causais entre modificações no tamanho do genoma e modificações no tamanho das estruturas estudadas.



**Figura 8. Estruturas morfológicas e tamanho do genoma.** Representação visual do tamanho de estruturas morfológicas (em cm, escala inferior) e valores médios dos tamanhos de genoma (valores 2C, em pg, escala superior). Barra Verde: altura da planta; Barra azul: diâmetro da roseta; Barra vermelha: comprimento do escapo floral; Círculos pretos: média dos valores de 2C. Em cada linha foram representados todos os valores de cada espécie, listadas à esquerda. As espécies foram ordenadas de baixo para cima em ordem crescente do tamanho do genoma.

## DISCUSSÃO

O valor 2C estimado varia entre 1,77 e 2,1 pg em *Dyckia* e 1,4 a 2,3 pg em *Encholirium*. Esses valores são muito próximos daqueles publicados anteriormente e disponíveis no Kew Royal Botanical Gardens: *D. estevesii* e *D. floribunda*, com 1,60 e 1,58 pg, respectivamente; e *E. Irwinii*, com 1,74 pg (Ebert e Till, 1997). Em contrapartida, se diferenciam bastante do outro gênero do “clado xérico” (*sensu* Givnish et al., 2007) da subfamília Pitcairnioideae, visto que

*Deuterocohnia* apresenta o valor médio de  $2C = 0,77$ , sendo que apenas dois valores estão disponíveis no bando de dados (*D. longipetala* (Baker) Mez = 0,74 pg e *D. schreiteri* Castellanos = 0,8 pg) (Ebert e Till, 1997). No “clado méxico” (*sensu* Givnish et al., 2007) da subfamília, *Pitcairnia* apresenta o valor médio de  $2C = 1,17$  pg (numa amostra de mais de 30 espécies,  $2C$  varia de 0,6 pg em *P. feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed a 1,44 pg em *P. flammea* (L. B. Smith) L. B. Smith) (Ebert e Till, 1997; Nunes, 2013) e *Fosterella* apresenta o valor de  $2C = 1,86$  em duas espécies: *F. penduliflora* e *F. villosula* (Ebert & Till, 1997).

Neste trabalho não foram encontradas diferenças significativas do tamanho dos genomas das espécies classificadas nos gêneros *Dyckia* e *Encholirium* ( $p = 0,9$ ). Isso por si só não constitui uma evidência de que os dois gêneros constituam um mesmo táxon dentro do “clado xérico”, já que tamanhos de genoma similares podem ser compartilhados por espécies em grupos taxonômicos distintos. A expectativa de detecção dessa diferença estava na suposição de que os caracteres morfológicos que diferenciam os gêneros, tivessem evoluído rapidamente, a partir de algum evento de modificação brusca do tamanho do genoma como aneuploidias ou duplicações cromossômicas. De fato, apesar da pequena amostragem disponível em *Deuterocohnia*, parece ter havido modificações do tamanho do genoma ao longo da separação entre *Deuterocohnia* (média = 0,77 pg) e *Dyckia* + *Encholirium* (média = 1,89). Santos-Silva et al. (2013) apontaram apomorfias anatômicas foliares em *Deuterocohnia* e outras em *Dyckia* + *Encholirium*. As modificações no tamanho do genoma podem ter sido abruptas e separado os grupos anatomicamente logo da separação entre eles ou podem ter se acumulado lentamente em ambos os grupos. No “clado méxico” parece ter havido um processo semelhante, já que a média de  $2C$  em *Pitcairnia* foi estimada em 1,17 pg e em *Fosterella* 1,86 pg e foram identificadas autoapomorfias em cada um desses gêneros (Santos-Silva et al. 2013).

A ausência de relação visual entre medidas de caracteres morfológicos (nesse caso altura da planta, diâmetro da roseta e comprimento do escapo floral) e o tamanho dos genomas das diferentes espécies pode ser devida à metodologia de obtenção das medidas morfológicas. Isso se justifica pelo fato de que as medidas foram obtidas em artigos de descrição de espécies, que apresentam apenas valores de amplitude (mínimo e máximo) ao invés de médias, variâncias e  $n$  amostral, parâmetros essenciais para a utilização dos dados em testes estatísticos. Ainda assim, é possível que essa ausência de correlação seja real. De qualquer forma, não há evidências de que a

evolução do tamanho do genoma em *Dyckia* e *Encholirium* seja adaptativa por estar correlacionada aos caracteres morfológicos estudados, como anteriormente sugerido em outros trabalhos em angiospermas (e.g. Wakamiya et al., 1993; Chung et al., 1998; Meagher e Costich, 2008).

Em suma, os valores estimados de tamanho de genoma em *Dyckia* e *Encholirium* não fornecem pistas de uma possível separação entre os gêneros, e a tentativa de correlação com medidas morfológicas não fornece evidências de evolução adaptativa no tamanho do genoma. Estudos posteriores devem focar a evolução do tamanho do genoma em Pitcairnioideae em busca de pistas mais concretas do papel das modificações do tamanho do genoma na evolução do grupo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, J. M. S.; SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; PINHEIRO, L. C.; SAMPAIO, F.; VICCINI, L. F. 2011. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 291: 133-140.
- CHESTER M.; GALLAGHER, J. P.; SYMONDS, V. V.; SILVA, A. V. C.; MAVRODIEV, E. V.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. 2012. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:1176-1181.
- CHUNG, J.; LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; GRAEF, G. L.; SPECHT, J. E. 1998. Relationships between nuclear DNA content and seed and leaf size in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1064–1068.
- CRISTIANO, M. P.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. & YOTOKO, K. S. C. 2012. Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*. 43: 527-538.
- DINIZ-FILHO, J. A. F.; TERRIBILE, L. C.; DE OLIVEIRA, G.; RANGEL, T. F. L. V. B. 2009. Padrões e processos ecológicos e evolutivos em escala regional. *Megadiversidade* 5: 5-16
- DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31: 113-120.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M.A.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter – laboratory comparison. *Annals of Botany* 82: 17-26.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99–110.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. 2007. Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes chromosomes and genome. Editora Wiley – VCH, 454p.
- EBERT, I.; TILL, W. 1997. Nuclear genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) with emphasis on the genus *Pitcairnia*. Abstracts, Angiosperm Genome Size Discussion Meeting. p. 15. *Royal Botanical Gardens, Kew*. p. 11–12.
- FORZZA, R. C. 2001. Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae–Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 208p.
- FREITAS, L.B.; BERED, F.B. 2003. Genética & Evolução Vegetal. Editora da UFRGS, Porto Alegre.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*. n. 220, p. 1049-1051.

- GIVNISH, T. J.; BARFUS, M. H. J.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A. et al. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eightlocus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98: 872–895.
- GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E. & SYTSMA, K. J. 2007. Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso*, 23: 3-26
- GREILHUBER, J. 2008. Cytochemistry and C – values: The less-well-know world of nuclear DNA amounts. *Annals of Botany* 101: 791-804.
- HAWKINS, B. A. 2001. Ecology’s oldest pattern? *Trends in Ecology and Evolution* 16: 470.
- LEE, Y. I.; CHANG, F. C.; CHUNG, M. C. 2011. Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady’s slipper orchids (*Paphiopedilum*). *Annals of Botany* 108: 113–121.
- LEPERS-ANDRZEJEWSKI, S.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S. C.; WONG, M.; DRON, M. 2011. Diversity and dynamics of plant genome size: an example of polysomaty from a cytogenetic study of tahitian vanilla (*Vanilla × Tahitensis*, Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 98: 986–997.
- MADAIL, R. H. 2011. Descritores morfológicos e conteúdo de DNA na caracterização de acessos de bananeira. Tese de Doutorado., Universidade Federal de Lavras, Lavras, 104p.
- MEAGHER, T. R.; COSTICH, D. E. 2008. ‘Junk’ DNA and phenotypic evolution in *Silene* section *Siphonomorpha*. *Genetics Research* 90: 111–118.
- MORAES, E. M.; YOTOKO, K. S. C.; MANFRIN, M. H.; SOLFERINI, V. N. & SENE, F. M. 2009. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, 36, 2136-2147.
- MOSCONE, E. A.; BARANYI, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIKER, A. T. 2003. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometria. *Annals of Botany* 92: 21-29.
- NUNES, A. C. P. 2013. Cariótipo, conteúdo de DNA e composição de bases (AT e GC) de *Pitcairnia flammea* (L. B. Smith) L. B. Smith (Bromeliaceae). Trabalho de conclusão de curso de graduação. Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 49p.
- OHNO, S. 1972. So much ‘junk’ in our genomes. In: Smith HH, ed. *Evolution of Genetic Systems*. Upton: Brookhaven Symposia in Biology. pp 366–370.
- OLIVER, M. J.; PETROV, F.; ACKERLY, D.; FALKOWSKI, P.; SCHOFIELD, O. M. 2007. The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. *Genome Research* 17:594–601.
- ORGEL, L. E.; CRICK, F. H. C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604–607.

- PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; FAY, M.M.; COZZOLINO, S. & LEXER, C. 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology*, 20: 3185-3201.
- PETROV, D. A. 2002. Mutational equilibrium model of genome size evolution. *Theoretical Population Biology* 61: 533–546.
- PRAÇA-FONTES, M. M.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; CRUZ, C. D. 2011. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant Cell Reports*. 30: 1183-1191.
- PRICE, H. J.; HODNETT, G.; JOHNSTON, S. 2000. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Annals of Botany* 86: 929-934.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. 2.14.1 ed. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- RESENDE, H. C.; YOTOKO, K.S.C.; DELABIE, J.H.C.; COSTA, M.A.; CAMPIOLO, S.; TAVARES, M.G.; CAMPOS, L.A.O. & FERNANDES-SALOMÃO, T.M. 2010. Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 949-960.
- SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; MONTEIRO, R. F.; PITA, P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. 2013. Invasion of the South American dry diagonal: What can the leaf anatomy of Pitcairnioideae (Bromeliaceae) tell us about it? *Flora* 208: 508-521.
- SOLTIS, P. S. & SOLTIS, D. E. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 561–588.
- SZADKOWSKI, E.; EBER, F.; HUTEAU, V.; LODE, M.; CORITON, O.; JENCZEWSKI, E.; CHEVRE, A. M. 2011. Polyploid formation pathways have an impact on genetic rearrangements in resynthesized *Brassica napus*. *New Phytologist*, 191: 884–894.
- VERSIEUX, L.M.; BARBARÁ, T.; WANDERLEY, M.D.; CAVALCANTE, A.; FAY, M.F. & LEXER, C. 2012. Molecular phylogenetics on the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64(1): 177–189
- WAKAMIYA, I. 1993. Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*. *American Journal of Botany* 80: 1235–1241.
- YOTOKO, K. S. C.; DORNELAS, M. C.; TOGNI, P. D.; FONSECA, T. C.; SALZANO, F. M.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. 2011. Does Variation in Genome Sizes Reflect Adaptive or Neutral Processes? New Clues from Passiflora. *Plos One*, v. 6, p. e18212.

## CONCLUSÃO GERAL

1. Não foram encontradas evidências de separação entre os gêneros *Dyckia* e *Encholirium* nas hipóteses filogenéticas moleculares obtidas nesse trabalho.
2. Não há diferenciação no tamanho do genoma das espécies de *Dyckia* e *Encholirium*, apesar de haver diferenças sensíveis entre os gêneros de Pitcairnioideae.
3. Os resultados desse trabalho, somados a outros resultados já publicados, sugerem a necessidade de revisão dos gêneros no sentido de verificar se trata-se de um único táxon.