

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Polystachya estrellensis Rchb.f. (Orchidaceae):
um estudo de caso para a colonização da Ilha da
Trindade

Narjara Lopes de Abreu

2015

UFRJ

Polystachya estrellensis Rchb.f. (Orchidaceae): um estudo de caso para a colonização da Ilha da Trindade.

Narjara Lopes de Abreu

Orientação:

Dr. Ruy José Valka Alves (Museu Nacional – UFRJ)

Dr. Sérgio Ricardo Sodré Cardoso (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro).

Dr. Alexandre Antonelli (University of Gothenburg)

2015

UFRJ

Polystachya estrellensis Rchb.f. (Orchidaceae): um estudo de caso para a colonização da Ilha da Trindade.

Narjara Lopes de Abreu

Orientação:

Dr. Ruy José Valka Alves (Museu Nacional – UFRJ)

Dr. Sérgio Ricardo Sodré Cardoso (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro).

Dr. Alexandre Antonelli (University of Gothenburg)

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Botânica).

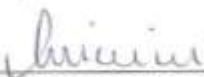
Aprovada por:



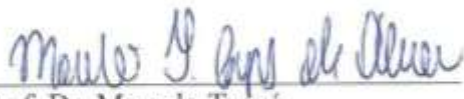
Presidente, Prof. Dr. Ruy José Valka Alves



Prof. Dr. Luiz Menini Neto



Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini



Prof. Dr. Marcelo Trovó



Prof. Dr. Maria Beatriz Barbosa de Barros Barreto

Rio de Janeiro

Março de 2015

Á minha irmã Amanda.

Meus sinceros agradecimentos,

Aos meus orientadores Ruy V. Alves, Sérgio R. Sodr e e Alexandre Antonelli por me permitirem alçar voos mais altos que minha própria ambi o. Em especial ao Professor Alexandre Antonelli, por me ajudar a concretizar as etapas finais e decisivas do meu trabalho.

Ao Programa de Pós Gradua o em Ciências Biológicas (Bot nica), pelo acesso ao ensino público.

  Coordena o de Aperfei amento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche, obtida através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE.

Ao Royal Swedish Academy of Sciences, European Research Council e Swedish Research Council pelo apoio financeiro recebido para o trabalho laboratorial.

Aos administradores e funcionários das Unidades de Conserva o visitadas, pela gentileza e apoio logístico.

  Universidade de Vienna, que através do Anton Russell e Michael Barfuss, por ceder parte das amostras de DNA utilizadas neste trabalho.

  Universidade de Gotemburgo, por toda infraestrutura oferecida para a realiza o do trabalho no período do estágio.

  Vivian Alden, pela ajuda e paciência imensuráveis na extra o do DNA e protocolos de PCR. Tack!

Ao Filipe Sousa, Yann Bertrand, Mats T pel, Climbi  Hall e Maria Fernanda Cali  pela ajuda no laboratório e análise dos dados.

Ao Lyderson F. Viccini, Matheus Rodrigues Pereira e José Marcelo Salabert de Campos, pelo auxílio na análise de citometria de fluxo.

  amiga Priscila Machado, pela revisão minuciosa da tese.

  Samira Furtado, Luiz Menini Neto, Tatiana Konno, Leonardo Alejandro, Alba Cordeiro, que gentilmente me acompanharam em alguns trabalhos de campo. Não me

esquecendo dos queridos amigos Carolina Matozinhos, Kelly Antunes e José Hugo Campos, parceiros de toda hora.

Aos amigos que fiz no Museu Nacional (Mariana Reis, Elaine Ribeiro, Ricardo Couto e Victor Tenório) e em Gotemburgo (Maria do Céu, Climbiê Hall, Maria Fernanda Calió, Thomas Hasper, Karine Bresolin, Grazielle Gustinelli e Romina Batista), por me proporcionarem momentos de intensa discussão e diversão. Foi um prazer!

Aos meus pais, irmãos e ao Bernardo, minha família, pelo amor, por me apoiarem incondicionalmente e por compreenderem minhas ausências.

Obrigada.

“E todo mundo explica tudo. Como a luz acende. Como um avião pode voar.”

Raul Seixas

RESUMO

Polystachya estrellensis Rchb.f. (Orchidaceae): um estudo de caso para a colonização da Ilha da Trindade.

Narjara Lopes de Abreu

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do Museu Nacional (Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

A filogenia molecular é uma poderosa ferramenta para estimar as relações, origem e história biogeográfica das espécies. No entanto, a maioria das árvores filogenéticas para organismos não-modelo ainda são baseadas em regiões simples ou com poucas sequências, usando método de sequenciamento tradicional (Sanger). Este por sua vez é um método oneroso, demorado e em alguns aspectos pouco confiável. O desenvolvimento de técnicas para sequenciamento paralelo em massa, mais conhecido como “*Next Generation Sequencing*” (NGS), surge como uma alternativa aos métodos tradicionais e permite o acesso à centenas de regiões do DNA. O uso da tecnologia do NGS vai ao encontro das atuais evidências que sugerem a necessidade de dezenas de genes não ligados para fornecer estimativas robustas de árvores de espécies e tempos de divergência. O presente trabalho teve o foco em um clado de *Polystachya* (Orchidaceae), gênero que se destaca por possuir interessantes aspectos citológicos (possui espécies poliploides e diploides), evolutivos (há evidência de evolução reticulada no gênero) e biogeográficos (algumas espécies são amplamente distribuídas nos trópicos; em contrapartida das 13 espécies encontradas no Brasil, 10 são endêmicas ao país). A filogenia foi capaz de resolver as relações entre os grupos do clado selecionado, com altos valores de suporte. Ao todo foram analisados 131.214 bp, entre regiões codificantes e não-codificantes do genoma cloroplastidial. As espécies que se divergiram primeiro são representadas por acessos africanos e as espécies mais recentes são neotropicais, resultado coerente com a história de origem do gênero, que mostra que a África é provavelmente o centro de origem dos táxons, com dispersão recente ao Neotrópico. Do ponto de vista molecular, *P. estrellensis* pode ser considerada uma

espécie distinta de *P. concreta* e *P. foliosa*, mas a delimitação de *P. concreta* permanece incerta. Nossos resultados destacaram que o aumento expressivo no número de nucleotídeos pode ser uma opção eficaz na inferência da filogenia em baixos níveis taxonômicos, mas considerando gêneros com grande número de espécies, como *Polystachya*, os genomas cloroplastidiais obtidos podem ser utilizados no rastreamento de marcadores altamente variáveis ao nível de gênero e talvez família. As análises biogeográficas apontam o Brasil como área ancestral mais provável do ancestral comum mais recente do clado que inclui as espécies brasileiras, descartando a hipótese de dispersão direta África-Brasil. A possível rota de dispersão utilizada pelo gênero inclui a utilização de pontes de terras pretéritas que ligavam a América do Norte oriental à Europa e a América do Norte ocidental à Ásia. A colonização da Ilha da Trindade por *Polystachya* é um dos eventos mais recentes dentro do clado estudado e o mesmo é resultado de eventos de dispersão a longas distâncias a partir do Brasil. Nossos resultados contribuíram para a resolução de algumas incongruências filogenéticas encontradas no gênero, bem como para novas interpretações da história biogeográfica do grupo.

Palavras-chave: sequenciamento paralelo em massa, colonização, filogenia, reconstrução de áreas ancestrais, datação.

ABSTRACT

Polystachya estrellensis Rchb.f. (Orchidaceae): a case study on the colonization of Trinidad's Island.

Narjara Lopes de Abreu

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do Museu Nacional (Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Molecular phylogeny is a powerful tool for estimating the relationships, origin, history and biogeography of species. However, most phylogenetic trees for non-model organisms are still based on single regions or few sequences using traditional Sanger methods. Notwithstanding, it is an expensive method, time consuming and unreliable in some aspects. The development of Massive Parallel Sequencing, also known as "Next Generation Sequencing" (NGS), is an alternative to traditional methods. The use of NGS technology can generate robust estimations of species tree and divergence times, since it allows the access to hundreds of unlinked genes. This project focuses on one clade *Polystachya* (Orchidaceae), a genus with interesting aspects in cytology (comprising both diploid and polyploid species), evolution (there is evidence of reticulate evolution) and biogeography (some species are widely distributed around the tropics; and 10 out of the 13 species found in Brazil are endemic to that country). The phylogeny was able to resolve the relationships within the selected clade with high support values. It was analyzed 131,214 bp of chloroplast genome, divided into coding and non-coding regions. The species that first diverged are represented by African access and the species that diverged more recently are neotropicals. This result is consistent with the history of the genre origin, showing that Africa is probably the center of origin of taxa, with recent spread the Neotropics. Considering a molecular point of view, *P. estrellensis* is a distinct species of *P. concreta* and *P. foliosa*, but the delimitation of *P. concreta* remains uncertain. Our results highlighted that the significant increase in the number of nucleotides can be an effective option to the inference of phylogeny at low taxonomic levels. However, considering genus with large

numbers of species, such as *Polystachya*, the chloroplast genomes obtained can be used for tracking highly variable markers in terms of genus and perhaps family. The biogeographical analyses show to Brazil as the most likely ancestral area of the most recent common ancestor of the clade that includes the Brazilian species, discarding the hypothesis of direct dispersion Africa-Brazil. The possible route of dispersion used by genus includes preterit land bridges connecting the eastern North America to Europe and Western North America to Asia. The colonization of the Trinidad's Island by *Polystachya* is one of the latest events within the clade studied, it is the result of dispersal events over long distances from Brazil. The results of this study contribute to the resolution of phylogenetic incongruences in the genus and provide new interpretations on the biogeographic history of the group.

Keywords: next generation sequencing, colonization, phylogeny, reconstruction of ancestral areas, molecular dating.

Rio de Janeiro

Março de 2015

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
<i>ILHAS: UMA GRANDE OPORTUNIDADE DE ESTUDOS EM BIOLOGIA</i>	17
<i>DADOS GENÉTICOS E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA OS ESTUDOS SOBRE A</i> <i>BIOLOGIA DE PLANTAS</i>	19
<i>OBJETIVOS</i>	22
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	23

CAPÍTULO 1

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE <i>Polystachya estrellensis</i> Rchb.f., ÚNICA ESPÉCIE DE ORQUÍDEA ENCONTRADA NA ILHA DA TRINDADE E CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO NÍVEL DE PLOIDIA DO GÊNERO	30
1.1. INTRODUÇÃO.....	31
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
1.2.1. <i>Amostragem dos táxons e isolamento do DNA</i>	34
1.2.2. <i>Amplificação e sequenciamento dos fragmentos de DNA</i>	35
1.2.3. <i>Análise Filogenética</i>	36
1.2.4. <i>Tamanho do genoma</i>	37
1.3. RESULTADOS	39
1.3.1. <i>Relações filogenéticas</i>	39
1.3.2. <i>Tamanho do genoma</i>	42
1.4. DISCUSSÃO	44
1.4.1. <i>Relações Filogenéticas</i>	44
1.4.2. <i>Tamanho do genoma</i>	46
1.5. CONCLUSÃO.....	50
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

CAPÍTULO 2

SEQUENCIAMENTO PARALELO EM MASSA E SUA UTILIDADE NA RESOLUÇÃO DE INCONGRUÊNCIAS FILOGENÉTICAS EM <i>Polystachya</i> Hook.	56
2.1. INTRODUÇÃO.....	57
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.2.1. <i>Desenho das sondas de captura do DNA</i>	59
2.2.2. <i>Sonicação e Preparação das bibliotecas genômicas</i>	60
2.2.3. <i>Enriquecimento e sequenciamento</i>	61

2.2.4. Edição das sequências	63
2.2.5. Análise filogenética.....	65
2.3. RESULTADOS	66
2.4. DISCUSSÃO	68
2.5. CONCLUSÃO.....	73
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

CAPÍTULO 3

EVIDÊNCIAS MOLECULARES DA COLONIZAÇÃO DA ILHA DA TRINDADE (BRASIL) E CONTRIBUIÇÕES PARA A BIOGEOGRAFIA DE <i>Polystachya</i> Hook.	
3.1. INTRODUÇÃO.....	83
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
3.3. RESULTADOS	89
3.4. DISCUSSÃO	93
3.4.1. Datação e reconstrução de áreas ancestrais.....	93
3.4.2. Perspectivas futuras.....	95
3.5. CONCLUSÃO.....	97
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Localidades escolhidas para a realização de coletas no Brasil.....	34
Tabela 2: Lista dos pares de primers retirada de Russell (2010 b) e utilizados neste estudo.....	35
Tabela 3: Comparação entre o tamanho do genoma das espécies de <i>Polystachya</i>	42
Tabela 4: Lista das espécies analisadas com concentração e pureza do DNA antes e após a montagem da biblioteca genômica.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Regiões do DNA plastidial utilizadas neste trabalho.	38
Figura 2: Árvore de consenso obtida pela análise Bayesiana no programa Mr.Bayes.	40
Figura 3: Histogramas gerados a partir da análise de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo.	43
Figura 4: <i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay & Sweet.	48
Figura 5: <i>Polystachya estrellensis</i> Rchb.f.	49
Figura 6: Metodologia utilizada na preparação das bibliotecas genômicas e o tempo médio gasto em cada etapa.	60
Figura 7: Metodologia usada para o enriquecimento da sequência.	64
Figura 8: Relações filogenéticas de um clado de <i>Polystachya</i> baseadas na inferência bayesiana e na análise do genoma quase completo do cloroplasto.	67
Figura 9: Mapa de localização da Ilha da Trindade.	85
Figura 10: Árvore datada de Orchidaceae baseado em sequências de DNA plastidial (matK e rbcL), usando três pontos internos de calibração.	90
Figura 11: Árvore de consenso usada na análise de reconstrução de áreas ancestrais, baseadas na inferência bayesiana, utilizando o BEAST e o genoma quase completo do cloroplasto.	91
Figura 12: Reconstrução de áreas ancestrais usando o Bayes-Lagrange, implementado no programa RASP (<i>Reconstruct Ancestral State in Phylogenies</i>).	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMR: Ancestral comum mais recente

AIC: Critério de informação Akaike

BLB: *Bering Land Bridge*/Ponte Terrestre de Bering

CTAB: Brometo de cetil-trimetilamônio. Detergente catiônico usado na extração de DNA.

CV: Coeficiente de variação

ESS: Tamanho efetivo da amostragem

Fase G1: Tempo decorrido entre o final da divisão celular e início da síntese do DNA, primeira fase da intérfase.

Fase G2: Tempo decorrido entre o final da síntese do DNA e o início da mitose, última fase da intérfase.

Kb: Kilobase

Ma: Milhões de anos

MCMC: Simulação Monte Carlo em Cadeias de Markov

mg: Miligrama

mL: Mililitro

NALB: *North Atlantic Land Bridge*/Ponte de Terra do Atlântico Norte

ng/μl: Nanograma por microlitro

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pb: Pares de base

pg: Picograma

DNA: Ácido desoxirribonucléico

SS: Análise de *stepping-stone*

μl: Microlitro

INTRODUÇÃO GERAL

ILHAS: UMA GRANDE OPORTUNIDADE DE ESTUDOS EM BIOLOGIA

As ilhas fornecem um ambiente propício para o desenvolvimento de diversos estudos que abrangem a grande área das Ciências Biológicas, principalmente aqueles cujos objetivos buscam testar e modelar padrões e processos acerca da evolução dos organismos (Crawford & Stuessy 1997; Emerson 2002). A importância desses ambientes para a biologia é tamanha que o título de “laboratórios naturais” se tornou comum entre os artigos científicos que tratam desses espaços.

A publicação da Teoria da Biogeografia de Ilhas de MacArthur & Wilson (1967) é um marco no estudo da ecologia de comunidades insulares, e de acordo com ela: o tamanho da ilha e seu isolamento influenciam o número de espécies, que por sua vez é determinado pelo balanço entre imigração e extinção; esse equilíbrio é dinâmico, com espécies sendo continuamente extintas enquanto outras colonizam a ilha e; as taxas de imigração e de extinção podem variar com o tamanho da ilha e isolamento (Begon *et al.* 2006). Desde então, os preceitos da Teoria de 1967 têm sido documentados para diversas ilhas (ex. Woodroffe 1986; Kohn & Walsh 1994; Ricklefs & Lovette 1999; Lomolino & Weiser 2001; Hovestadt & Poethke 2005; Hannus & von Numers 2008; Whittaker *et al.* 2008).

Acompanhando os avanços da biologia molecular, os estudos sobre os ambientes insulares utilizam também as correlações que envolvem principalmente dados genéticos. Por exemplo, Emerson & Oromi (2005) indicam que diversidade específica e a diversidade genética estão correlacionadas ao tamanho da ilha, à distância do continente e a fatores adicionais como características biológicas dos imigrantes, dinâmica geológica da ilha, heterogeneidade ambiental e especiação. McLaughlin *et al.* (2014) testaram como os níveis de diversidade genética se relacionam com a área da ilha, diversidade de plantas, sua distância do continente e com a ilha mais próxima.

Entre as relações mais estudadas está a comparação entre a diversidade genética das populações insulares e seus parentes continentais. Uma gama de trabalhos mostra que comparativamente as plantas encontradas em ilhas possuem menor diversidade

genética (ex. Franks 2010; Yamada & Maki 2012). Em contrapartida, outros estudiosos buscam provar que esta não é uma regra para todos os organismos, e que em alguns casos, a maior diversidade genética está nos organismos insulares e não nos continentais (ex. Fernández-Mazuecos & Vargas 2011; Désamoré *et al.* 2012).

Em especial, as ilhas destacam-se pelas altas taxas de espécies endêmicas, as quais são resultado da combinação dos processos de dispersão, estabelecimento e diversificação evolutiva da progênie dos colonizadores. Tal processo evolutivo pode acontecer rapidamente em ilhas oceânicas, após os eventos de dispersão e estabelecimento, devido à falta de competidores e predadores, amplo espectro de nichos ecológicos, e presença de mecanismos de isolamento geográfico (Carlquist 1974).

A chegada dos colonizadores a uma ilha distante está limitada ao transporte pelo vento, transporte por aves ou correntes oceânicas. Por este motivo, nestes ambientes é comum que os táxons venham de linhagens que se dispersam por estas vias (Carlquist 1966). Neste caso, floras de ilhas oceânicas recentes provêm indícios da viabilidade da dispersão a longas distâncias das espécies (Moran & Smith 2001), indicando muitas vezes sua atuação como *Stepping Stone*, ou “trampolim para espécies” (Flenley 1984) entre continentes.

Um aspecto interessante sobre a colonização de ilhas é a taxa de evolução de características que afetam a dispersão. Cody & Overton (1996) mostraram evidências de que plantas que colonizaram ilhas sofreram redução na capacidade de dispersão a longas distâncias em um prazo de 10 anos. Usando como modelo os arquipélagos dos Açores, Canárias e Madeira, Hutsemékers *et al.* (2011) refutam esta hipótese, demonstrando que o poder de dispersão de uma espécie de musgo não diminuiu no ambiente insular e além disso, estes arquipélagos podem ter sido a principal fonte de biodiversidade para a recolonização da Europa pós glacial, por plantas produtoras de esporos. Desta forma a chamada colonização inversa pode ter grande importância na interpretação de alguns padrões biogeográficos (Bellemain & Ricklefs 2008).

Os estudos com foco na biodiversidade insular brasileira tiveram início no século XIX com a publicação da flora de Fernando de Noronha (Ridley 1888). No entanto, hoje são raros os estudos sobre a flora insular no Brasil e poucos trabalhos são feitos em ilhas continentais (ex. Barros *et al.* 1991; Oliveira 2002; Kemenes 2003; Bovini *et al.* 2013, 2014) e oceânicas (ex. Batistella 1996; Alves 1998, 2006). Estes

estudos estão focados principalmente na caracterização geral da vegetação e na listagem, distribuição espacial e conservação das espécies.

As Ilhas da Trindade e de Fernando de Noronha estão entre as ilhas brasileiras mais impactadas pela ação antrópica, cujos efeitos são refletidos na biota atualmente encontrada em ambas. Dentre as principais ameaças à biodiversidade local estão a introdução de espécies exóticas, extração predatória e edificações (Serafini *et al.* 2010). A Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000, que regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, e institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza, garante em seu artigo 44 que:

“As ilhas oceânicas e costeiras destinam-se prioritariamente à proteção da natureza e sua destinação para fins diversos deve ser precedida de autorização do órgão ambiental competente.”

Embora as ilhas oceânicas e costeiras tenham sua proteção garantida por lei, fica evidente a necessidade de programas de conservação/recuperação da biodiversidade local, seja pela vulnerabilidade da biota devido ao espaço geográfico restrito, especificidade nas interações, e em alguns casos menor variabilidade genética ou pela possibilidade desses ambientes guardarem uma rica fonte de biodiversidade com potencial para recolonização de ambientes costeiros por algumas espécies. Seja nos ambientes insulares ou não, o conhecimento da biodiversidade em toda sua complexidade é um grande aliado dos projetos de manejo e conservação ambiental.

DADOS GENÉTICOS E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA OS ESTUDOS SOBRE A BIOLOGIA DE PLANTAS

Sequências de DNA plastidial têm se mostrado um excelente recurso para estudos filogenéticos das principais linhagens das angiospermas (Jansen *et al.* 2007; Moore *et al.* 2007, 2010; Stull *et al.* 2013) e especificamente na filogenia de Orchidaceae (Cameron 2005; Van den Berg *et al.* 2005; Ficher *et al.* 2007). Aos níveis de população e biogeográfico, o genoma plastidial é uma poderosa ferramenta principalmente quando combinado à múltiplos genes nucleares não ligados (Wittall *et al.* 2010). O uso do genoma plastidial completo está cada vez mais acessível como

ferramenta para estudos filogenéticos em plantas, principalmente pelo rápido avanço da tecnologia *next generation sequencing*, ou apenas NGS (Moore *et al.* 2010; Cronn *et al.* 2012).

O panorama encontrado hoje nos estudos de filogenia é o do uso de um único ou poucos genes, concatenados ou não, para a resolução de filogenias e investigação de histórias biogeográficas. No último Congresso Nacional de Botânica realizado no Brasil, aproximadamente 31% dos trabalhos inscritos na área de taxonomia/filogenética consideraram apenas dados morfológicos. O restante dos trabalhos utilizam poucos genes nucleares, plastidiais, ou ambos (Anais do 65º Congresso Nacional de Botânica 2014).

Mesmo com o decréscimo nos últimos anos dos custos de sequenciamento do DNA, o uso de múltiplos *loci* para inferir a história de espécies e populações requer grande quantidade de recursos se utilizarem técnicas tradicionais. Além disso, a geração de dados para estudos de múltiplos *loci* usando as técnicas de sequenciamento de Sanger é trabalhosa e mais propensa a erros de sequenciamento (Mardis 2008 a; Bräutigam & Gowik 2010).

As técnicas de sequenciamento de nova geração (sequenciamento paralelo em massa, ou *next generation sequencing* – NGS) representam uma alternativa ao método Sanger de sequenciamento. Em comum, todas elas são capazes de gerar informações sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, diferindo apenas na plataforma utilizada para o sequenciamento do DNA (para uma revisão das plataformas existentes consultar Mardis 2008 a, b; Metzker 2010). A plataforma Illumina, utilizada neste trabalho, consiste na síntese do DNA usando a DNA polimerase e nucleotídeos terminais marcados com corante fluorescente. A clonagem dos fragmentos é feita *in vitro* em uma plataforma de vidro. Esse processo é chamado PCR de fase sólida. Sumariamente, as duas extremidades dos fragmentos do DNA genômico de cadeia simples são ligadas à adaptadores e então esses ligam-se aleatoriamente à superfície de clonagem, criando uma ponte de amplificação. Enzimas e nucleotídeos não marcados são fornecidos para iniciar a ponte de amplificação de fase sólida e a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. Por fim, ocorre a desnaturação das moléculas de cadeia dupla para então recomençar todo o processo (Mardis 2008 b).

Dados recentes revelam que o uso de cerca de 100 *loci* podem resultar em estimativas mais confiáveis de relações filogenéticas e tempos de divergência (Song 2012). Neste contexto, o uso da técnica do NGS justifica-se pela geração de um volume adequado de dados em tempo e custo viáveis.

Outra importante fonte de informação para a filogenia e biogeografia se refere aos dados sobre o tamanho do genoma e a ploidia das espécies. Em alguns casos, a poliploidização tem como consequência direta o aumento do tamanho do genoma. Por sua vez, o caráter conservativo do tamanho do genoma pode ser usado como ferramenta da biosistemática, auxiliando as explicações acerca das relações entre as espécies (Gregory 2001) principalmente em baixos níveis taxonômicos. Por exemplo, em plantas homoplóides, ou seja, que possuem o mesmo número de cromossomos e tamanho de genoma diferente, o tamanho do genoma tem grande potencial para separar grupos com baixa distinção morfológica, ou híbridos inter-específicos (Zonneveld *et al.* 2001; Loureiro *et al.* 2010). Em termos biogeográficos, a poliploidia por vezes é considerada uma característica relacionada ao aumento na capacidade de colonizar novos *habitats*, incluindo ilhas oceânicas (deWet 1980 *apud* Soltis & Soltis 2009; Chase *et al.* 2003; Hegarty & Hiscock 2008).

Desde o século passado, diversos autores têm trabalhado com estimativas da ocorrência de poliploidização nas angiospermas (para uma revisão do assunto consultar Otto 2007) e hoje, acredita-se que quase 35% das plantas com flores são de origem poliploide recente (Wood *et al.* 2009).

Além disso, evidências apoiadas em análises genômicas sugerem pelo menos uma rodada de poliploidização nos ancestrais da maioria das plantas, indicando que a poliploidização pode ter contribuído para a sobrevivência e propagação de várias linhagens de plantas durante ou após os eventos de extinção do Cretáceo–Terciário (Fawcett *et al.* 2009).

As vantagens trazidas pela poliploidização, devido ao aumento no conjunto de genes e alelos disponíveis para seleção, alimentam a especulação de que as duplicações do genoma levam ao aumento da diversidade. No entanto, a frequência dos eventos de especiação que são acompanhados pela poliploidização, permanece incerta. Otto & Whitton (2000) estimaram taxas entre 2 a 4% e em contraste, Wood *et al.* (2009)

descrevem que nas angiospermas 15% dos eventos de especiação estão associados à poliploidização.

Surpreendentemente, análises recentes revelam que raros poliploides sobrevivem em longo prazo devido às maiores taxas de extinção comparadas aos seus parentes diploides (Mayrose 2011, Arrigo & Barker 2012). Além disso, se o novo poliploide formado permanece em simpatria com seus parentais diploides, o risco de extinção é elevado pela competição (Ramsey & Schemske 1998, 2002). Em contrapartida, acredita-se que a amplitude ecológica suportada pelos poliploides permite-lhes a ocupação de nichos diferentes dos ocupados por seus progenitores diploides, reduzindo assim a exclusão por competição (Segraves *et al.*, 1999; Maherali *et al.* 2009). Glennon *et al.* (2014) destacam a capacidades de dispersão e outros traços de história de vida para explicar persistência do poliploide à longo prazo. Desta forma, o estabelecimento de uma linhagem poliploide e sua persistência ao longo do tempo dependerá do balanço entre a desvantagem e vantagens ecológicas trazidas pelo aumento do genótipo.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi iniciar a discussão sobre a colonização da Ilha da Trindade, integrando uma hipótese filogenética mais robusta, encontrada através da tecnologia de sequenciamento paralelo em massa, à duas metodologias de análise biogeográfica histórica: o Relógio Molecular Relaxado e a reconstrução de áreas ancestrais. Adicionalmente buscamos resolver as inongruencias filogenéticas encontradas dentro do clado estudado. Os resultados encontrados estão organizados em três capítulos:

- Relações filogenéticas da única espécie de orquídea encontrada na Ilha da Trindade e contribuição para o conhecimento do nível de ploidia do gênero.
- Sequenciamento paralelo em massa e sua utilidade na resolução de nós difíceis em *Polystachya* Hook.
- Evidências moleculares da colonização da Ilha da Trindade (Brasil) e contribuições para a biogeografia de *Polystachya* Hook.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, R. J. V. 1998. Ilha da Trindade e Arquipélago Martin Vaz: Um ensaio geobotânico. Rio de Janeiro: Serviço de Documentação da Marinha. 144 p.
- Alves, R. J. V. & Castro, J. W. A. (orgs.). 2006. Ilhas oceânicas brasileiras: da pesquisa ao manejo. MMA Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 298 p., Brasília, DF, Brasil. ISBN: 8587166913.
- Arrigo, N. & Barker, M. S. 2012. Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. *Current Opinion in Plant Biology* 2012, 15:140–146
- Barros, F.; Melo, M. M. R. F.; Chiea, S. A. C.; Kirizawa, M.; Wanderley, M. G. L. & Jung-Mendaçolli, S. L. 1991. Caracterização geral da vegetação e listagem das espécies ocorrentes; pp. 1–184, in: M.M.R.F. Melo, F. Barros, M.G.L. Wanderley, M. Kirizawa, S.L. Jung-Mendaçolli and S.A.C. Chiea (ed.). *Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso*. Vol.1. São Paulo: Instituto de Botânica.
- Batistella, M. 1996. Espécies vegetais dominantes do Arquipélago de Fernando de Noronha: grupos ecológicos e repartição espacial. *Acta Botânica Brasilica*, 10 (2): 223–235.
- Begon, M.; Harper, J. L.; Towhsend, C. R. 2006. *Fundamentos em Ecologia*. Porto Alegre: Artmed. 592p.
- Bellemain, E. & Ricklefs, R. E. 2008. Are islands the end of the colonization road? *Trends Ecol Evol* 23:461–468.
- Bovini, M. G.; Faria, M.; Oliveira, R. R. & Kurtz, B. C. 2013. Flora terrestre vascular: riqueza, biogeografia e vulnerabilidades; pp. 138–161, in: F. Moraes, A. Bertoncini and A. Aguiar. (ed.). *História, pesquisa e biodiversidade do Monumento Natural das ilhas Cagarras*. Série Livros, 48. Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- Bovini, M. G.; Faria, M.; Oliveira, R. R. & Kurtz, B. C. 2014. Floristic diversity of the Cagarras Islands Natural Monument, Rio de Janeiro, Brazil. *Check List* 10(2): 366–373.

- Bräutigam, A. & Gowik, U. 2010. What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biology*, 12:831–841.
- Cameron, K. M. 2005. Leave it to the leaves: A molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae). *Amer. J. Bot.*, 92: 1025–1032.
- Carlquist, S. 1966. The biota of long-distance dispersal. IV. Genetic systems in the floras of oceanic islands. *Evolution* 20: 433–455.
- Carlquist, S. 1974. *Island Biology*. Columbia University Press, New York.
- Chase, M. W.; Cameron, K. M.; Barrett, R. L. & Freudenstein, J. V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. Pp. 69–89 in: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L. & Cribb, P.J., (eds.), *Orchid conservation*. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo).
- Cody, M. L. & Overton, J. M. 1996. Short-term evolution of reduced dispersal in island plant populations. *Journal of Ecology*, 84: 53–61.
- Cronn, R.; Knaus, B. J.; Liston, A. P.; Maughan, J.; Parks, M.; Syring, J. V. & Udall, J. 2012. Targeted enrichment strategies for next-generation plant biology. *American Journal of Botany*, 99: 291-311.
- Crowford, D. J. & Stuessy, T. F. 1997. Plants speciation in oceanic islands. In *Evolution and Diversification of Land Plants* (ed. Iwatsuki, K. & Raven, P. H.). Springer Verlag, Tokyo.
- Désamoré, A.; Laenen, B.; González-Mancebo, J. M.; Jaén Molina, R.; Bystriakova, N.; Martinez-Klimova, E; Carine, M. A. & Vanderpoorten, A. 2012. Inverted patterns of genetic diversity in continental and island populations of the heather *Erica scoparia* s.l. *Journal of Biogeography*, 39 (3): 574–584.
- deWet, J. M. J. 1980. Origins of polyploids. In *Polyploidy-Biological Relevance*, ed. WHLewis, pp. 3-15, New York: Plenum Press
- Emerson, B. C. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding patters and process. *Molecular Ecology*, 11: 951-966.

- Emerson, B. C. & Oromi, P. 2005. Diversification of the forest beetle genus *Tarphius* on the Canary Islands, and the evolutionary origins of island endemics. *Evolution*, 59:586-598.
- Fawcett, J. A.; Maere, S. & Van de Peer, Y. 2009. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *PNAS*, 106 (14): 5737-5742.
- Fernández-Mazuecos, M. & Vargas, P. 2011. Genetically depauperate in the continent but rich in oceanic islands: *Cistus monspeliensis* (Cistaceae) in the Canary Islands. *PLoS ONE* 6:17172.
- Fischer, G. A.; Gravendeel, B.; Sieder, A.; Andriantiana, J.; Heiselmayer, P.; Cribb, P. J.; Smidt, E. D. C.; Samuel, R. & Kiehn, M. 2007. Evolution of resupination in malagasy species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *Molec. Phylog. Evol.*, 45:358-376.
- Flenley, J. R. 1984. Time Scales in Biogeography. In: (Ed.) Taylor, J. A. *Biogeography: Recent Advances and Future Directions*.
- Franks, S. J. 2010. Genetics, evolution, and conservation of island plants. *Journal of Plant Biology*, 53: 1–9
- Glennon, K. L.; Ritchie¹, M. E. & Segraves¹, K. A. 2014 Evidence for shared broad-scale climatic niches of diploid and polyploid plants. *Ecology Letters*.
- Gregory, T.R. 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 76, 65–101.
- Hannus, Jens-Johan & von Numers, M. 2008. Vascular plant species richness in relation to habitat diversity and island area in the Finnish Archipelago. *Journal of Biogeography*, 35: 1077-1086.
- Hegarty M. J. & Hiscock, S. J. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Curr. Biol.*, 18: 435–444.
- Hovestadt, T. & Poethke, H. J. 2005. Dispersal and establishment: spatial patterns and species-area relationships. *Diversity and Distributions*, 11: 333-340.

- Hutsemékersa, V.; Szövényi, P.; Shaw, A. J.; González-Mancebo, J-M; Muñoz, J. & Vanderpoorten, A. 2011. Oceanic islands are not sinks of biodiversity in spore-producing plants. *PNAS*, 108 (47): 18989-18994.
- Jansen, R. K.; Cai, Z.; Raubeson, L. A.; Daniell, H.; Depamphilis, C. W.; Leebens-Mack, J.; Müller, K. F.; Guisinger-Bellian, M.; Haberle, R. C.; Hansen, A. K.; Chumley, T. W.; Lee, S. B.; Peery, R.; McNeal, J. R.; Kuehl, J. V. & Boore, J. L. 2007. Analysis of 81 genes from 64 plastid genomes resolves relationships in angiosperms and identifies genome-scale evolutionary patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 19369-19374.
- Kemenes, A. 2003. Distribuição espacial da flora terrestre fanerogâmica do Parque Nacional Marinho de Abrolhos, BA. *Revista Brasileira de Botânica* 26(2): 141-150.
- Kohn, D. D & Walsh, D. M. 1994. Plant Species Richness-The Effect of Island Size and Habitat Diversity. *Journal of Ecology*, 82 (2): 367-377.
- Lomolino, M. V. & Weiser, M. D. 2001. Towards a more general species-area relationship: diversity on all islands, great and small. *Journal of Biogeography*, 28: 431-445.
- Loureiro, J.; Travnicek, P.; Rauchova, J.; Urfus, T.; Vit, P.; Štech, M.; Castro, S. & Suda, J. 2010. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia*, 82:3-21.
- MacArthur, R. H. & Wilson, E. O. 1967. *The Theory of Islands Biogeography*. Princeton University Press, Princeton.
- Maherali, H.; Walden, A. E & Husband, B. C. 2009. Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. *New Phytol.*, 184: 721-731.
- Mardis, E. R. 2008 a. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24 (3):133-141.
- Mardis, R. M. 2008 b. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9: 387-402.

- Mayrose, I.; Zhan, S. H.; Rothfels, C. J.; Magnuson-Ford, K.; Barker, M. S.; Rieseberg, L. H. & Otto, S. P. 2011. Recently Formed Polyploid Plants Diversify at Lower Rates. *Science*, 333.
- Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11:31-46.
- Moore, M. J.; Bell, C. D.; Soltis, P. S. & Soltis, D. E. 2007. Using plastid genomic-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 19363-19368.
- Moore, M. J.; Soltis, P. S.; Bell, C. D.; Burleigh, J. G. & Soltis, D. E. 2010. Phylogenetic analysis of 83 plastid genes further resolves the early diversification of eudicots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 4623-4628.
- Moran, R. C & Smith, A. R. 2001. Phylogeographic relationships between neotropical and African-Madagascan pteridophytes. *Brittonia*, 53: 304-351.
- Oliveira, R. R. 2002. Ação antrópica e resultantes sobre a estrutura e composição da Mata Atlântica na Ilha Grande, RJ. *Rodriguésia*, 53 (82): 33–58.
- Otto, S. P. 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell* 131.
- Otto, S. P. & Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 34:401-37.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 29:467-501
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 33:589-639.
- Ricklefs, R. E & Lovette, I. J. 1999. The roles of island area per se and habitat diversity in the species-area relationships of four Lesser Antillean faunal groups. *Journal of Animal Ecology*, 68: 1142-1160.
- Ridley, H. N. 1888. Notes on the botany of Fernando de Noronha. *Journal of the Linnean Society*, 27: 1-112.

- Segraves, K. A.; Thompson, J. N.; Soltis, P. S & Soltis, D. E. 1999. Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. *Mol. Ecol.*, 8: 253-62.
- Serafini, T. Z.; França, G. B. & Andriquetto-Filho, J. M. 2010. Ilhas oceânicas brasileiras: biodiversidade conhecida e sua relação com o histórico de uso e ocupação humana. *Revista da Gestão Costeira Integrada*, 10(3):281-301.
- Soltis, P. S. & Soltis, D. E. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60: 56-88
- Stull, G. W.; Moore, M. J.; Mandala, V. S; Douglas, N. A.; Kates, H. R.; Qi, X.; Brockington, S. F.; Soltis, P. S.; Soltis, D. E & Gitzendanner, M. A. 2013. A Targeted Enrichment Strategy for Massively Parallel Sequencing of Angiosperm Plastid Genomes. *Applications in Plant Sciences*, 1 (2).
- Van den Berg, C., Goldman, D.H., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Cameron, K.M. & Chase, M.W. 2005. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.* 92: 613–624.
- Whittaker, R. J.; Triantis, K. A. & Ladle, R. J. 2008. A general dynamic theory of oceanic island biogeography. *Journal of Biogeography*, 35: 977–994.
- Whittall, J. B.; Syring, J.; Parks, M.; Buenrostro, J.; Dick, C.; Liston, A. & Cronn, R. 2010. Finding a (pine) needle in a haystack: Chloroplast genome sequence divergence in rare and widespread pines. *Molecular Ecology*, 19 (Supplement): 100-114.
- Wood, T. E.; Takebayashic, N.; Barker, M. S.; Mayrose, I.; Greenspoond, P. B. & Rieseberg, L. H. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *PNAS*, 106 (33): 13875-13879.
- Woodroffe, C. D. 1986. Vascular plant species-area relationships on Nui Atoll, Tuvalu, Central Pacific: a reassessment of the small island effect. *Australian Journal of Ecology*, 11: 21-31.

- XI Congreso Latinoamericano de Botánica/ LXV Congresso Nacional de Botânica, Sixth International Rubiaceae and Gentianales Conference e XXXIV Encontro Regional de Botânicos de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo (ERBOT). 2014. Salvador, Bahia. Anais do LXV Congresso Nacional de Botânica. Disponível em <http://www.botanica.org.br/>.
- Yamada, T. & Maki, M. 2012. Impact of geographical isolation on genetic differentiation in insular and mainland populations of *Weigela coraeensis* (Caprifoliaceae) on Honshu and the Izu Islands. *Journal of Biogeography*, 39, 901–917.
- Zonneveld, B. J. M. 2001. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions. *Plant Systematics and Evolution*, 229:125-130.

CAPÍTULO 1

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE *Polystachya estrellensis* Rchb.f., ÚNICA
ESPÉCIE DE ORQUÍDEA ENCONTRADA NA ILHA DA TRINDADE E
CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DO NÍVEL DE PLOIDIA DO
GÊNERO**

1.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Polystachya* Hook. é formado por aproximadamente 240 espécies e possui amplitude de distribuição geográfica pouco usual entre Orchidaceae, sendo encontrada por toda a faixa tropical do globo, com espécies registradas no Neotrópico, África e Ásia tropicais e ilhas do Oceano Índico. Apenas poucas espécies atingem o subtropical, na África do Sul e América do Sul (Mytnik-Ejmont 2011). A África é o principal centro de diversidade de espécies (Dressler 1993) e também onde são encontrados os maiores centros de diversidade genética (Russell 2010 b). De acordo com Russell (2010 b) um desses centros de diversidade genética, o chamado “*Great Rift System*” no leste africano, é provavelmente o centro de origem dos táxons. No Brasil o gênero está representado por 13 espécies, das quais 10 são endêmicas ao país (Barros *et al.* 2010).

As espécies de *Polystachya* podem ser epífitas, litófitas ou terrestres. Possuem velame nas raízes, pseudobulbos, folhas conduplicadas e anteras caducas portando polínias rígidas. A inflorescência é terminal, com brácteas estéreis no pedúnculo, flores não-ressupinadas, com os segmentos do perianto interno, incluindo o labelo, não excedendo o perianto externo. Além disso, a base das sépalas laterais é fundida à coluna formando um mento e o labelo é usualmente trilobado (Freudenstein *et al.* 2002).

A análise molecular mais recente sobre a grande subfamília Epidendroideae (Pridgeon *et al.* 2009) confirma a posição de *Polystachya* dentro de Polystachyinae, excluindo *Hederorkis* e *Imerinaea* antes consideradas integrantes desta subtribo, juntamente com *Neobenthamia* (Dressler 1981). Dados moleculares também confirmam a inclusão de *Neobenthamia* dentro de *Polystachya* (Russell *et al.* 2010 b). Atualmente, mais dez gêneros foram incluídos em Polystachyinae, a maioria deles compostos por poucas espécies (Mytnik-Ejmont 2011). Não há concordância quanto ao posicionamento da tribo, Chase *et al.* (2003) e Pridgeon *et al.* (2005) incluem Polystachyinae dentro de Vandaeae, enquanto Freudenstein & Rasmussen (1999), Cameron (2001) e van den Berg *et al.* (2005) consideram a tribo como grupo irmão de Vandaeae.

Polystachya forma um grupo monofilético (Russell *et al.* 2010 b; Mytnik-Ejmont 2011), porém as 15 seções que reúnem as diversas espécies (Kraenzlin 1926,

Summerhayes 1942, 1947 *apud* Russell 2011 b; Brenan 1954; Cribb 1978) são polifiléticas ou parafiléticas, com exceção de *Isochiloides*, única seção monofilética (Russell *et al.* 2010 b). Neste mesmo trabalho, Russell *et al.* (2010 b) apontam novas divisões infragenéricas, monofiléticas do ponto de vista molecular, no entanto as relações entre várias espécies permanecem não resolvidas.

As relações entre os membros do grupo de espécies pantropicais, que inclui *P. concreta* (Jacq.) Garay & Sweet, *P. foliosa* (Hook.) Rchb.f., *P. bicolor* Rolfe, entre outras, não são bem resolvidas devido aos baixos níveis de divergência de sequência entre as espécies, tanto em genes plastidiais quanto nucleares (Russell *et al.* 2010 a; Russell 2010 b; Russell 2011; Mytnik-Ejsmont 2011). Muito da variação observada ao longo dos trópicos é taxonomicamente combinada sob o nome de *P. concreta*. Embora na lista oficial de espécies da flora do Brasil, *P. estrellensis* seja mantida como uma espécie válida (Barros *et al.* 2010), ainda não há consenso sobre a sinonimização, ou não, desta espécie com *P. concreta*. Isso é refletido no vasto material de herbário, cujas identificações ora consideram estes dois morfotipos como espécies distintas, ora como a mesma espécie. O mesmo ocorre com o *P. foliosa*, cujo nome só seria corretamente aplicado às plantas da bacia Amazônica, o escudo da Guiana, e as Índias Ocidentais (Peraza-Flores *et al.* 2011). Essa circunscrição não é aceita por Mytnik-Ejsmont (2011) que considera *P. estrellensis* espécie sinônima de *P. foliosa*.

A incongruência na delimitação das espécies que possuem ampla distribuição geográfica e pouca variação morfológica pode ser causada pelo uso de características morfológicas que não indicam ancestralidade comum, quando áreas maiores são consideradas (Russell *et al.* 2010 a). Por exemplo, Pansarin & Amaral (2006) separam *P. concreta* e *P. estrellensis*, com base nas diferenças encontradas na forma da flor, seu tamanho e sua inserção nas raques, possivelmente as mesmas características usadas por Barros *et al.* (2010).

A distribuição de *P. estrellensis* e *P. concreta* no Brasil segue os domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado e Floresta Atlântica. A espécie *P. estrellensis* é considerada endêmica do Brasil (Barros *et al.* 2010), enquanto *P. concreta* tem seus limites de distribuição estendidos à faixa tropical da África, algumas localidades da América Central e Ásia (Russell 2010 a).

A reconstrução filogenética possibilita a formulação de hipóteses das relações entre organismos, sob uma perspectiva evolutiva (Matioli *et al.* 2012), podendo também subsidiar estudos de dinâmica populacional, hibridação, seleção natural, reconstrução dos estados de caracteres ancestrais, além de auxiliar estimativas do tempo de divergência de linhagens ou espécies.

O objetivo deste capítulo introdutório é analisar a posição filogenética de *P. concreta* e *P. estrellensis* brasileiras através da inclusão de novos terminais à árvore filogenética já existente para o gênero. Os novos terminais são representados por amostras de *P. concreta* coletadas no Brasil continental e de *P. estrellensis* coletadas no Brasil continental e na Ilha da Trindade. Além disso, esta primeira análise abriu espaço para a discussão de novas metodologias de acesso aos dados genéticos e interpretações mais modernas destes dados. Neste capítulo utilizamos os espaçadores rps16-trnK e psbD-trnT, que representam as mesmas regiões do DNA plastidial incluídas no estudo de Russell *et al.* (2010 b).

Adicionalmente realizamos a análise de citometria de fluxo para um representante brasileiro de *P. concreta* e dois representantes de *P. estrellensis*, um da Ilha da Trindade e o outro da costa brasileira. O gênero tem cerca de 25% das suas espécies com a ploidia mapeada, dentre os quais apenas um indivíduo neotropical foi incluído (Rupp *et al.* 2010). A poliploidia por vezes é considerada uma característica relacionada com o aumento na capacidade de colonizar novos *habitats*, incluindo ilhas oceânicas (deWet 1980 *apud* Soltis & Soltis 2009; Chase *et al.* 2003; Hegarty & Hiscock 2008).

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Amostragem dos táxons e isolamento do DNA

Foram coletadas amostras de *P. estrellensis* e *P. concreta* em seis localidades no Brasil continental, além de *P. estrellensis* obtida na Ilha da Trindade (Tabela 1).

Tabela 1: Localidades escolhidas para a realização de coletas no Brasil.

<i>Espécie</i>	<i>Registro</i>	<i>Município</i>	<i>Localidade</i>	<i>Altitude</i>
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 250	-	Ilha da Trindade	500-620 m
<i>P. concreta</i>	N.L.Abreu 251	Ituberá-BA	Reserva Ecológica da Michelin	160-327 m
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 252	Morro do Chapéu-BA	Parque Estadual do Morro do Chapéu	1.100 m
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 253	Santa Teresa-ES	Estação Biológica de Santa Lúcia	550-950 m
<i>P. concreta</i>	N.L.Abreu 254	Brasília-DF	Parque Nacional de Brasília	28-65 m
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 255	Rio Preto-MG	Serra Negra	900-1600m
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 256	Cananéia-SP	Parque Estadual Ilha do Cardoso	0-800m

Cinco diferentes protocolos de extração do DNA foram testados: Kit Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel), o método de extração utilizando CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987), o protocolo de extração descrito em Russell *et al.* (2010), o método de extração utilizando CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987) com modificações e por último o Kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Os melhores resultados foram obtidos com os dois últimos protocolos supracitados. Devido à maior rapidez e facilidade de execução optou-se pelo uso do Kit DNeasy Plant Mini Kit para processar todo o material. A extração foi realizada seguindo as instruções contidas no manual do Kit. O DNA foi obtido utilizando 10 mg de tecido seco em sílica gel e as duas eluições obtidas no último passo do protocolo foram mantidas separadas para testes posteriores de amplificação do DNA. O protocolo com o método de extração utilizando CTAB 2% modificado está descrito no Anexo I.

1.2.2. Amplificação e sequenciamento dos fragmentos de DNA

A análise filogenética foi realizada utilizando os *primers* para marcadores plastidiais descritos na publicação de Russell (2010 b) (Tabela 2). Ao sequenciar as duas regiões do cloroplasto utilizadas pelo autor supracitado (espaçadores rps16-trnK e psbD-trnT), obtivemos um fragmento com cerca de 7 Kb (Figura 1).

Tabela 2: Lista dos pares de primers retirada de Russell (2010 b) e utilizados neste estudo.

	<i>Pares utilizados</i>	<i>Referências</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Resultado da amplificação</i>
1	matK1200For	5'-GTATTGGGTCATCCTATTAGTAAACC-3'	72°C	Amplificou
	trnKR3an	5'-TCGAACCCGGAAGTAGTCGG-3'	64°C	Amplificou
2	matK550For	5'-TGRTTCAAATCCTTCAATGCTGGATC-3'	70°C	Amplificou
	matK1326R	5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'	64°C	Amplificou
3	matK-50Fmo	5'-GTTCTGACCATATTGCACTATGTATC-3'	72°C	Amplificou
	matK750Ror	5'-ATGTGTTTCGCTCAAGAAAGACTCC-3'	70°C	Amplificou
4	trnKF5an	5'-GTTGCTAACTCAAYGGTAGAGTACTC-3'	70°C	Não amplificou
	matK50Ror	5'-TGAGCAAGTGAGTAAATAKACTCCTG-3'	72°C	Não amplificou
5	rps16F2mo	5'-CTYGAGCCGTATGAGGARAAAACY-3'	62°C	Amplificou
	trnKR5an	5'-CCYTTSAGGATCAGTCGTGGTC-3'	62°C	Amplificou
6	rpsF	5'-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT-3'	72°C	Amplificou
	rpsR2	5'-TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC-3'	70°C	Amplificou
7	psbD	5'-CTCCGTARCCAGTCATCCATA-3'	60°C	Amplificou
	trnT(GGU)-R	5'-CCCTTTTAACTCAGTGGTAG-3'	58°C	Amplificou

O DNA extraído foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram preparados 25µl de reação, contendo 12,5µl PCR G-mix [2x], 0,1µl Dream Taq DNA (Thermo Scientific) [5U/ µl], 0,5µl MgCl [25 Mm], 1µl de cada *primer* [20 µM], 8,9µl de água Milli-Q. As duas eluições obtidas no último passo da extração do DNA foram testadas separadamente, sendo assim, foi adicionado ao máster mix 0,5µl de DNA quando testada a 1ª eluição e 1µl de DNA, quando testada a 2ª eluição da extração. O ajuste do termociclador seguiu o seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação inicial à 95°C por 1,5 minutos, 40 ciclos para os passos de desnaturação (à 95°C por 30 segundos), anelamento (30 segundos) e extensão (72°C por 10 minutos) e 1 ciclo para a extensão final à 72°C por 10 minutos. A temperatura de anelamento de cada *primer* foi obtida seguindo as orientações do kit Dream Taq DNA Polymerase.

A única região que não apresentou resultado por este método (Tabela 2) foi amplificada novamente utilizando-se os *primers* rps16 F2 e matK750Ror e o Kit Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs). Este Kit é específico para ampliações de longos fragmentos ou aqueles de difícil amplificação. O objetivo foi amplificar uma região maior (ca. 2.700 pb) que englobasse a região com dificuldade de amplificação. Os *primers* matK50Ror e trnKF5an foram fornecidos como *primers* internos. Foram preparadas reações de 50µl contendo: 10µl de Q5 reaction buffer [5x], 1µl de dNTP [10mM], 1,5µl de DNA Polymerase, 2,5µl de cada primer [10µM], 31,5 de água MilliQ e 1µl de DNA. O ajuste do termociclador seguiu os seguintes passos: 1 ciclo de desnaturação inicial à 98°C por 30 segundos, 40 ciclos para os passos de desnaturação (à 98°C por 1,3 minutos), anelamento (à 68°C por 30 segundos) e extensão (à 72°C por 1, 30 minutos) e 1 ciclo para a extensão final à 72°C por 2 minutos.

O sequenciamento dos produtos da PCR foi realizado pela Macrogen Inc. e a montagem e a edição das sequências foram processadas no programa Geneious 5.1 (Biomatters Ltd).

1.2.3. Análise Filogenética

Foram compiladas na matriz combinada de dados, 127 sequências de DNA plastidial (espaçador rps16-trnK e espaçador psbD-trnT) disponíveis no Genbank somadas à amostragem feita neste trabalho. As sequências foram alinhadas usando o programa MAFFT 7 (Kato & Standley 2013) gerando uma matriz com 134 indivíduos e 7.342 caracteres. O programa MEGA (Tamura *et al.* 2013) foi utilizado para obter o número de sítios polimórficos e descrever a média da frequência das bases das sequências analisadas.

Os modelos evolutivos adotados na análise bayesiana foram determinados utilizando o programa jModel Test. 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012), aplicando-se o modelo designado pelo Akaike Information Criterion (AIC) em *default*. Cada região da matriz foi dividida em três partições (introns, éxons e espaçadores) e analisadas separadamente. Foram aplicados os seguintes modelos evolutivos: GTR+G para os espaçadores psbD-TrnT e rps16-trnK e para o exon matK CDS e; GTR+I+G para o exon rps16 CDS e para os íntrons rps16 e trnK.

A análise filogenética foi estimada por inferência bayesiana, com o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). O suporte dos cladogramas foi calculado usando probabilidades posteriores Bayesianas estimadas como a frequência dos cladogramas nas árvores retidas após o *burn-in*.

1.2.4. Tamanho do genoma

A citometria de fluxo é uma técnica baseada na análise da dispersão da luz e da fluorescência de partículas em uma suspensão líquida. No caso dos estudos com plantas, analisa-se a intensidade de fluorescência relativa de núcleos isolados de folhas jovens e corados com um fluorocromo específico para o DNA. Como resultado é produzido um histograma com um pico maior que corresponde aos núcleos que se encontram na fase G1 do ciclo celular e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G2. Para estimar o tamanho do genoma (ou a quantidade de DNA), a posição do pico G1 de um histograma é comparada com o pico de uma planta padrão com o tamanho do genoma conhecido (Doležel 1997).

Para obter os valores estimados do tamanho do genoma das espécies em questão foram utilizadas folhas jovens e frescas de um indivíduo de *P. concreta* coletado na Estação Biológica de Santa Lúcia, no Espírito Santo e dois indivíduos de *P. estrellensis* coletados na Serra Negra, Minas Gerais e na Ilha da Trindade. Como padrão, utilizamos folhas frescas de ervilha (*Pisum sativum* L.). A análise foi realizada no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Com a ajuda de uma lâmina, fragmentos de folha com cerca de 2 x 2 cm foram triturados manualmente em uma placa de Petri contendo 1 ml do tampão de lise LB01. Devido à presença de muita mucilagem após a trituração, os pedaços maiores de folha foram separados manualmente para facilitar a filtração. As células em suspensão foram então filtradas através de uma malha de nylon com 5 µm para remover detritos celulares maiores. O DNA foi corado com 50 µL de Iodeto de Propídio [1mg/mL]. As medições foram realizadas usando um citômetro de fluxo.

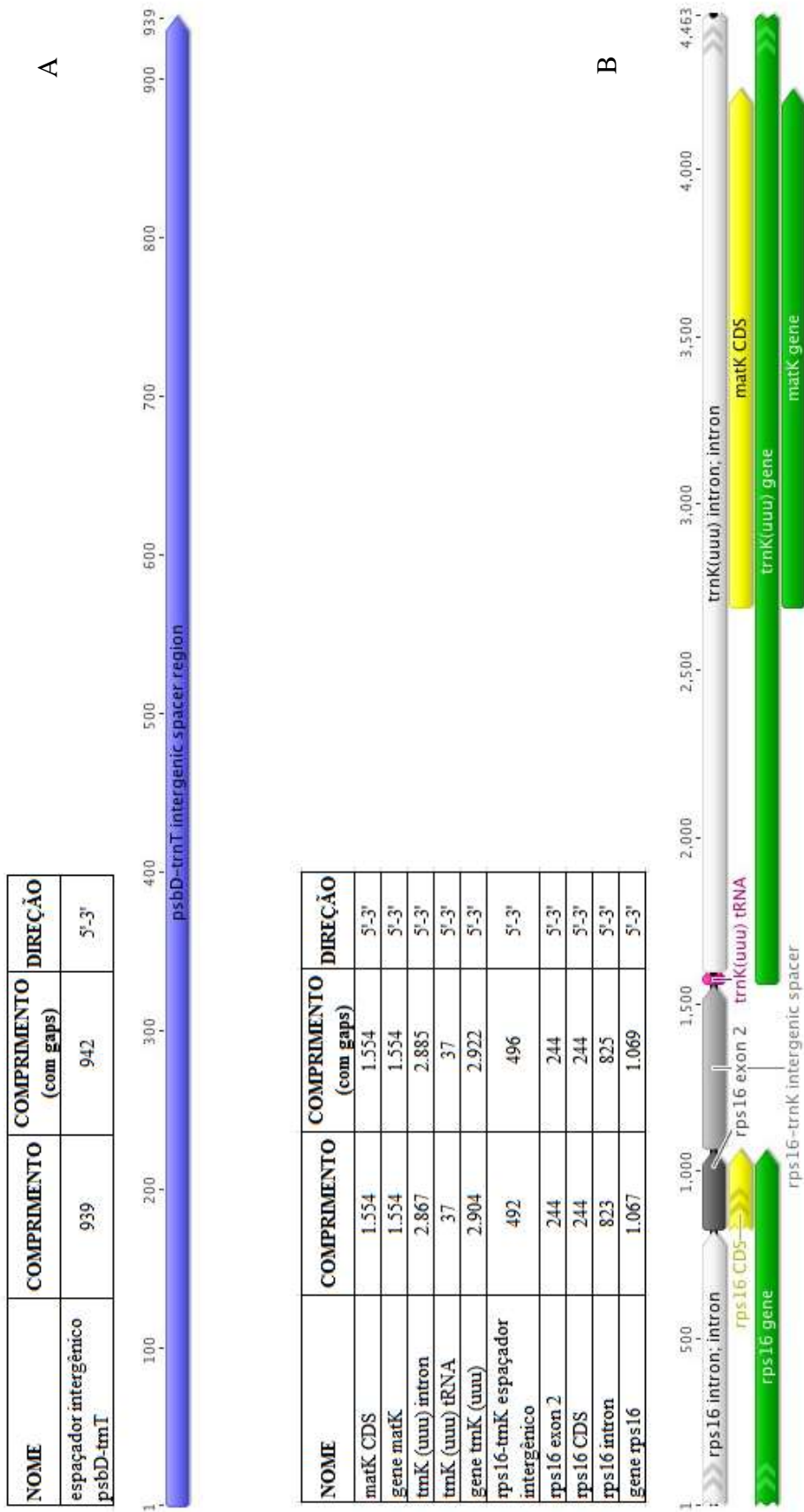


Figura 1: Regiões do DNA plastídial utilizadas neste trabalho. A: Espaçador rps16-trnK. B: Espaçador psbD-trnT

1.3. RESULTADOS

1.3.1. *Relações filogenéticas*

O número total de sítios polimórficos foi 170 para o espaçador psbD-trnT e de 855 para o espaçador rps16-trnK. O alinhamento dos dados concatenados demonstrou uma média de composição de nucleotídeos de A=33,4%, C=14,9%, G=15,6% e T=36,1%.

A matriz combinada de dados, analisada por inferência bayesiana resultou em uma árvore que evidencia o monofiletismo do gênero (Bayesian posterior probability, Bpp = 1) e a alta divergência das sequências das espécies escolhidas como grupo externo (Figura 2), resultados semelhantes aos apresentados por Russell (2010 b). No entanto, nossos resultados apontam *Phalaenopsis* como grupo irmão de *Polystachya* (Bpp = 0,91) e uma relação bem resolvida entre os membros do grupo externo. *P. affinis*, *P. ottoniana* e *P. longiscapa* permanecem como linhagens mais antigas. De acordo com esta nova análise, *P. neobenthamia* e *P. dendrobiiflora*, juntamente com *P. goetzeana* e *P. vaginata* formam o grupo irmão (Bpp = 0,94) do grande clado que contém o restante das espécies do gênero (Bpp = 0,69).

Nenhum dos principais clados monofiléticos definidos por Russell (2010 b) foi inteiramente recuperado nesta nova análise. Segundo a figura 2, *P. setifera* (antes Clado I, Bpp = 1) aparece como linhagem irmã do Clado III (Bpp = 0,57), bem como *P. eurychila* (antes do Clado III, Bpp = 1), agora aparece como linhagem irmã do Clado IV (Bpp = 0,51). A incongruência mais forte é representada pelas espécies pertencentes ao Clado V (Bpp = 1) e que agora são encontradas em várias posições na árvore.

Como esperado, as novas amostras de *P. concreta* e *P. estrellensis* incluídas nesta análise agruparam-se com no Clado III (Bpp = 1) porém formaram uma grande politomia junto com *P. odorata*, *P. foliosa*, *P. henrici*, *P. modesta* e outros acessos de *P. concreta*.

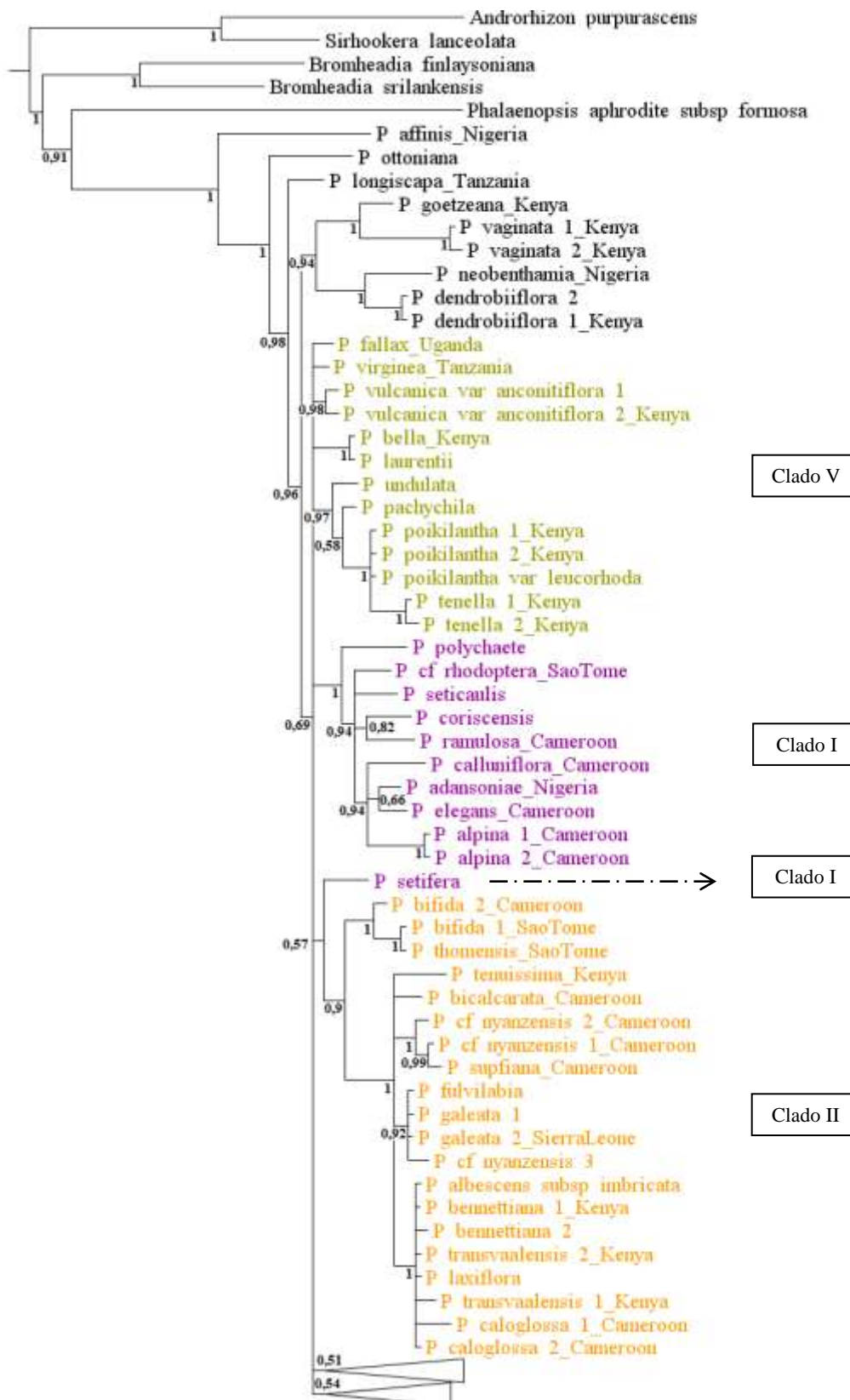
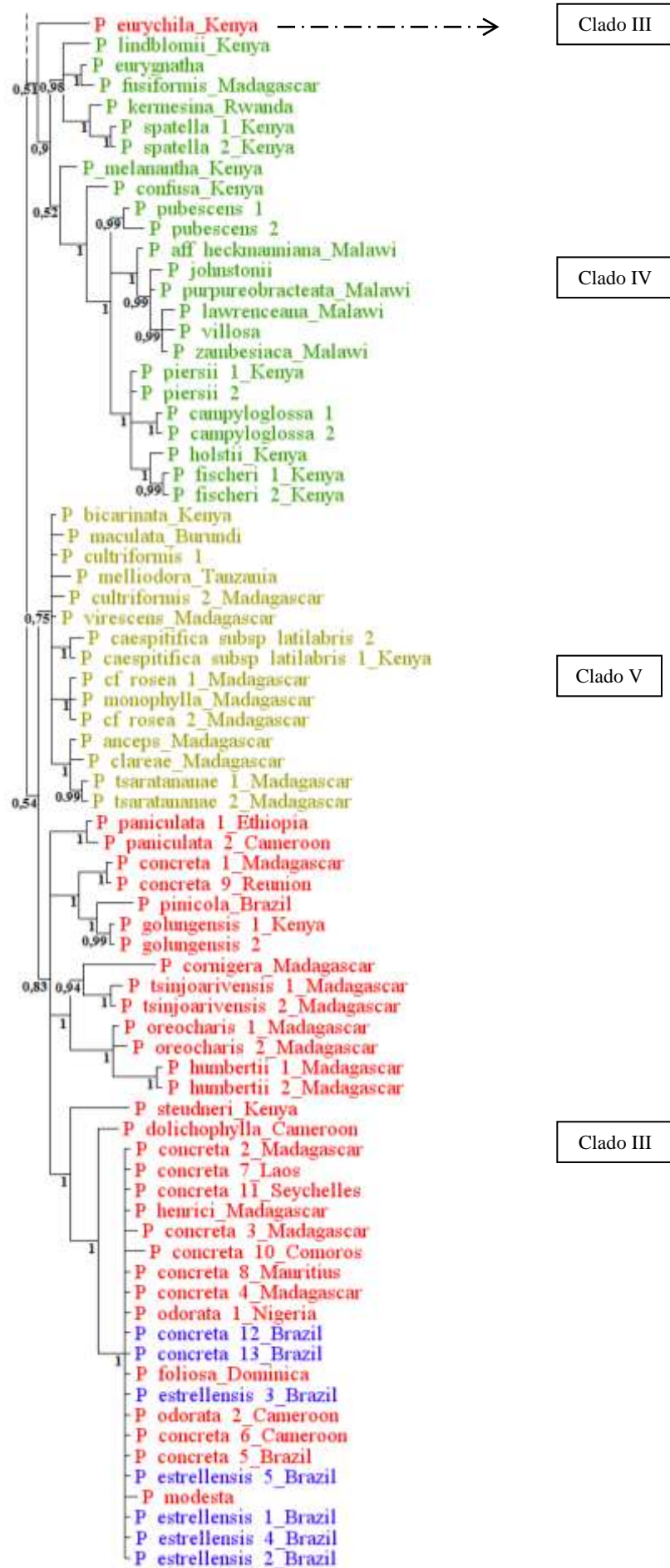


Figura 2: Árvore de consenso obtida pela análise Bayesiana no programa Mr.Bayes. O comprimento dos ramos é proporcional ao número esperado de substituições por sítio. Os terminais coloridos em roxo, alaranjado, vermelho, verde e marrom correspondem respectivamente aos clados I, II, III, IV e V definidos por *Russell* (2010 b). As espécies escritas em azul correspondem aos terminais incluídos neste trabalho. Os valores de suporte correspondem à probabilidade posterior Bayesiana.

Figura 2: Continuação.



1.3.2. Tamanho do genoma

Os histogramas de fluorescência mostrados na figura 3 representam a distribuição do conteúdo do DNA nuclear obtida pela análise de citometria de fluxo. Os valores do coeficiente de variação ($CV < 0,5\%$) encontrados nas três análises são considerados aceitáveis (Galbraith *et al.* 2002) (Tabela 3). Isso significa que o protocolo empregado possibilitou acesso à quantidade suficiente de núcleos intactos, isolados e corados. De acordo com os resultados obtidos, foi encontrada apenas uma pequena variação no tamanho do genoma entre os três indivíduos analisados (Tabela 3). Os resultados mostraram também que o tamanho do genoma destes indivíduos é semelhante ao tamanho do genoma de uma amostra de *P. estrellensis*, cuja área de coleta não foi registrada e de indivíduos poliploides de *P. concreta* coletados na Ásia, África, e algumas Ilhas localizadas no Oceano Índico, incluindo Madagascar (Tabela 3).

Vale destacar que os indivíduos coletados neste estudo também possuem o tamanho do genoma semelhante ao de *P. foliosa* (Rupp *et al.* 2010), espécie encontrada em uma grande politomia junto com *P. concreta* e *P. estrellensis* (Figura 1). O estudo citogenético do gênero confirmou que as espécies que possuem o tamanho do genoma entre 1,33-1,54 pg são tetraploides e possuem 80 cromossomos (Russell *et al.* 2010b).

Nesta politomia, também são encontradas espécies diploides, como *P. modesta* e *P. odorata* e alguns indivíduos de *P. concreta* (Rupp 2010). Estas espécies possuem cerca de metade do tamanho do genoma (ou quantidade de DNA) das espécies tetraploides e são portanto diploides (Russell *et al.* 2010b).

Tabela 3: Comparação entre o tamanho do genoma das espécies de *Polystachya*.

Espécie	Local da coleta	Ploidia	Tamanho do genoma 1C (pg)	Referência
<i>P. estrellensis</i>	Brasil, Ilha da Trindade	4x*	1,53	Este estudo
<i>P. estrellensis</i>	Brasil, Minas Gerais	4x*	1,52	Este estudo
<i>P. estrellensis</i>	Brasil	4x	1,39	Rupp <i>et al.</i> 2010
<i>P. concreta</i>	Brasil, Espírito Santo	4x*	1,63	Este estudo
<i>P. concreta</i>	República Democrática Popular Lau, São Tomé e Príncipe	2x	0,71-0,75	Rupp <i>et al.</i> 2010
<i>P. concreta</i>	Comores, República Democrática Popular Lau, Madagascar, República da Maurícia, Ilha Réunion, Zimbabwe	4x	1,33-1,54	Rupp <i>et al.</i> 2010

*Forte indício de tetraploidia.

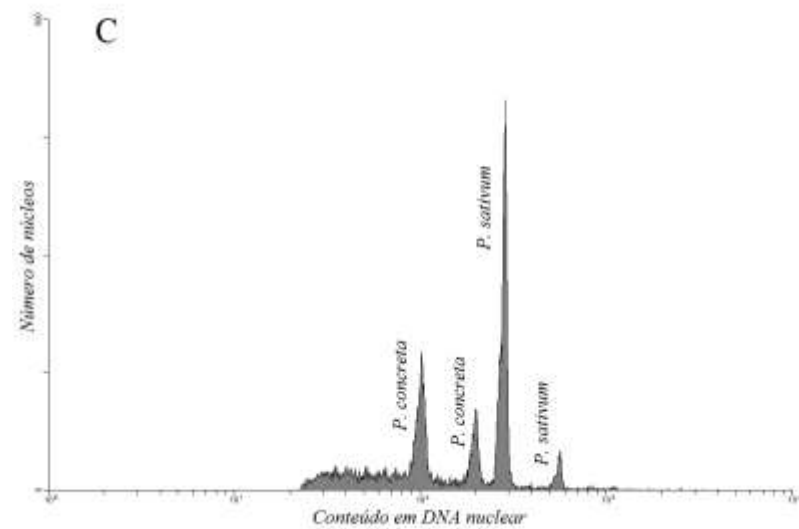
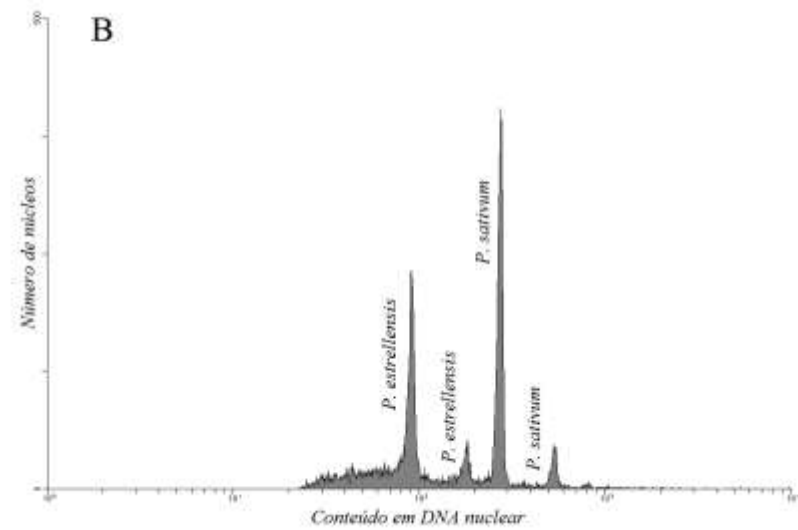
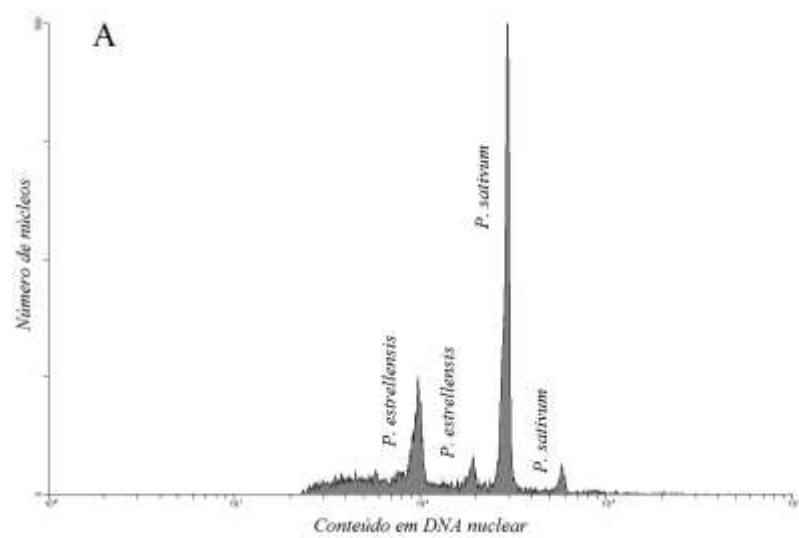


Figura 3: Histogramas gerados a partir da análise de suspensões nucleares coradas com iodeto de propídeo. (A) Picos representando os núcleos nas fases G1 e G2 de *P. estrellensis* coletada na Ilha da Trindade (1C = 1,53 pg). (B) Picos representando os núcleos nas fases G1 e G2 de *P. estrellensis* coletada na Serra Negra, MG (1C = 1,52 pg). (C) Picos representando os núcleos nas fases G1 e G2 de *P. concreta* coletada E.B.Santa Lúcia, ES (1C = 1,63 pg). *P. sativum* foi utilizada como padrão interno nas três análises (1C = 4,55 pg).

1.4. DISCUSSÃO

1.4.1. *Relações Filogenéticas*

Os dois estudos filogenéticos anteriores realizados com *Polystachya* (Russell *et al.* 2010; Mytnik-Ejsmont 2011) e os resultados deste trabalho mostraram divergências sobre as relações entre as espécies do gênero. Em Mytnik-Ejsmont (2011), seis matrizes diferentes foram analisadas utilizando máxima parcimônia e inferência bayesiana, e resultaram em 12 topologias distintas. Em geral, as árvores filogenéticas geradas pela análise de máxima parcimônia (Russell 2010b; Mytnik-Ejsmont 2011) apresentam relações mais bem resolvidas entre os grandes clados internos comparando-se com as árvores geradas por inferência bayesiana apresentadas em Mytnik-Ejsmont (2011) e neste estudo.

Obviamente, a primeira explicação para tais divergências é o uso de distintos métodos de análise e alinhamento das sequências. Os métodos bayesianos representam uma nova perspectiva de análise de árvores filogenéticas e também novas formas de avaliação dos modelos utilizados na inferência filogenética (Fan *et al.* 2011; Xie *et al.* 2011). Este método ganhou popularidade na última década, com os progressos de *hardware* e das técnicas de amostragem com métodos de simulação Monte Carlo em Cadeias de Markov (MCMC). O MCMC é o método numérico mais usado para formulação da probabilidade posterior de uma árvore feita por inferência bayesiana (Huelsenbeck *et al.* 2001). Ressalta-se neste ponto, que métodos filogenéticos que não consideram os modelos para variedade de processo de substituição de nucleotídeos podem convergir em uma árvore errada por não aproveitar inteiramente as informações contidas nas sequências de DNA (Huelsenbeck *et al.* 2001), ou seja, mesmo apresentando maior resolução, as árvores geradas a partir da máxima parcimônia podem representar uma visão equivocada das relações históricas entre as espécies.

Os poucos estudos destinados ao gênero *Polystachya*, tratam das relações filogenéticas, citologia, variação genética e evolução do grupo como um todo (Russell *et al.* 2009; 2010; 2011; Mytnik-Ejsmont 2011). Especificamente no Brasil, não existem trabalhos destinados à taxonomia do grupo, negligenciando a complexidade morfológica e filogenética existente. Como consequência, a identificação de espécies

morfologicamente semelhantes, como é o caso de *P. estrellensi*, *P. concreta* e *P. foliosa* é muitas vezes controversa.

Durante as excursões de campo, foi possível observar *in loco*, os dois morfotipos, comumente identificados como *P. concreta* e *P. estrellensis*. Nas áreas amostradas estas espécies não se encontram em simpatria. As características morfológicas usadas para a separação destas duas espécies são o tamanho do indivíduo e o formato do botão floral (Figuras 4 e 5). Em *P. estrellensis*, o botão floral é esférico e as plantas variam de cerca de 12 cm a 24 cm de comprimento. Já os indivíduos de *P. concreta* podem variar de cerca de 20 cm a 60 cm de comprimento e possuem o botão floral falciforme, devido ao alongamento do pé da coluna e a adnação deste com as sépalas dorsais.

Estimativas das relações históricas utilizando diferentes *loci*, e por diferentes métodos são obstáculos na inferência da filogenia de *Polystachya*. Ressalta-se que o uso de uma ou poucas regiões é especialmente problemático considerando espécies proximamente relacionadas (Heled & Drummond 2010), como é o caso do grupo formado por *P. concreta*, *P. estrellensis*, *P. foliosa* e outras. Isso ocorre porque as diferenças entre os genes vindos de populações distintas podem ser semelhantes às diferenças entre os genes dentro de uma população (Degnan & Rosenberg 2009).

A possibilidade da mudança do atual paradigma dos estudos em filogenia molecular representa um importante avanço na inferência das relações históricas entre as espécies. Isso significa que está cada vez mais difundido o sequenciamento de múltiplos *loci* independentes (Kubatko & Degnan 2007; Heled & Drummond 2010) e o uso de mais indivíduos por espécie (Heled & Drummond 2010) em detrimento à amostragem de um grande número de indivíduos e apenas um *locus* gênico.

A utilização de múltiplos *loci* na reconstrução filogenética hoje é facilitada pela disponibilidade de novas tecnologias de sequenciamento e acesso aos dados genéticos. O sequenciamento paralelo em massa, ou *Next Generation Sequencing* (NGS), é um método revolucionário capaz de processar milhões de leituras de seqüências de DNA reduzindo custos e tempo de trabalho (McCormack 2013).

Interpretações mais modernas indicam que a história dos genes utilizados em trabalhos de filogenia pode ser diferente da história evolutiva das espécies (Yang &

Rannala 2012). A probabilidade das diferenças entre a topologia da árvore de genes e da árvore de espécies pode ser investigada sob a luz da Teoria da Coalescência aplicada à filogenia. Resumidamente, as diferentes topologias podem existir porque duas ou mais linhagens de um determinado gene podem coexistir na mesma população ancestral.

Buscando estimativas mais robustas das relações entre as espécies que formam a grande politomia junto com *P. estrellensis* e *P. concreta*, no capítulo 2 apresentamos os resultados da análise utilizando a tecnologia NGS e as espécies definidas por Russell *et al.* (2010) como pertencentes ao clado III.

1.4.2. Tamanho do genoma

A poliploidização é o processo de aumento do tamanho do genoma, causado pela adição de um ou mais conjuntos de cromossomos e representa a mudança mais expressiva que pode ocorrer na estrutura do genoma (Otto 2007). Dependendo da persistência, esta mutação pode ter diferentes significados evolutivos: seja por possibilitar o aparecimento de novas características que interferem no valor adaptativo de indivíduos ou como responsável pelo aparecimento de uma nova espécie (Soltis & Soltis 1993, 1999).

A avaliação do nível de ploidia é realizada com exatidão por estudo citológico, através da contagem de cromossomos em células mitóticas e/ou meióticas (Schifino-Wittmann 2001). No entanto, diversos trabalhos têm utilizado a citometria de fluxo para este fim (ex. Walker *et al.* 2004; Muthamia *et al.* 2014). Nestes casos, a inferência do nível de ploidia é obtida pela comparação de picos que representam núcleos na fase G1 do ciclo celular em um histograma, como na Figura 3.

Os poucos e recentes estudos dedicados a explorar o tamanho do genoma em *Polystachya* encontraram importantes resultados sobre sua correlação com a ploidia, biogeografia e características da anatomia interna (Rupp 2010; Russell 2010b). Estes estudos cobriram cerca de 25% das espécies do gênero (Rupp 2010) e sugerem que a citometria de fluxo pode ser usada para inferir a ploidia em *Polystachya*. Embora a confirmação da ploidia seja feita com testes citológicos, de acordo com os resultados obtidos, as espécies *P. concreta* e *P. estrellensis* coletadas no Brasil continental e na Ilha da Trindade e incluídas na análise possuem forte indício de tetraploidia.

A poliploidização é considerada uma das mais importantes características potencializadoras do estabelecimento e radiação de um táxon em ilhas distantes (Hegarty & Hiscock 2008; Crawford *et al.* 2009). Sua tolerância ecológica mais ampla comparada com a de indivíduos diploides, faz com que os poliploides sejam fortes candidatos também a se dispersarem a longas distâncias com sucesso. O estudo recente realizado por Linder & Barker (2014) mostrou a ligação entre poliploidia e dispersão a longas distâncias, sugerindo que os poliploides são mais bem sucedidos nesta estratégia do que os diploides. Essa capacidade pode ter facilitado a dispersão das gramíneas entre continentes, contribuindo assim para o seu sucesso evolutivo (Linder & Barker 2014).

Sabe-se que no complexo que envolve *P. concreta* e *P. estrellensis*, aqueles grupos que se dispersaram para fora da África são tetraploides, as plantas encontradas na África continental podem ser diploides ou tetraploides e que as espécies irmãs africanas de *P. concreta* são diploides (Russell *et al.* 2010b). Esses resultados sugerem a ocorrência de poliploidia nos indivíduos de *Polystachya* colonizadores da Ilha da Trindade. Se uma dada linhagem poliploide é capaz de colonizar uma ilha distante, saber se o evento de poliploidização ocorreu durante a radiação e diversificação desta linhagem ou após a colonização, ainda é uma questão que merece atenção dos estudiosos (Crawford *et al.* 2009).

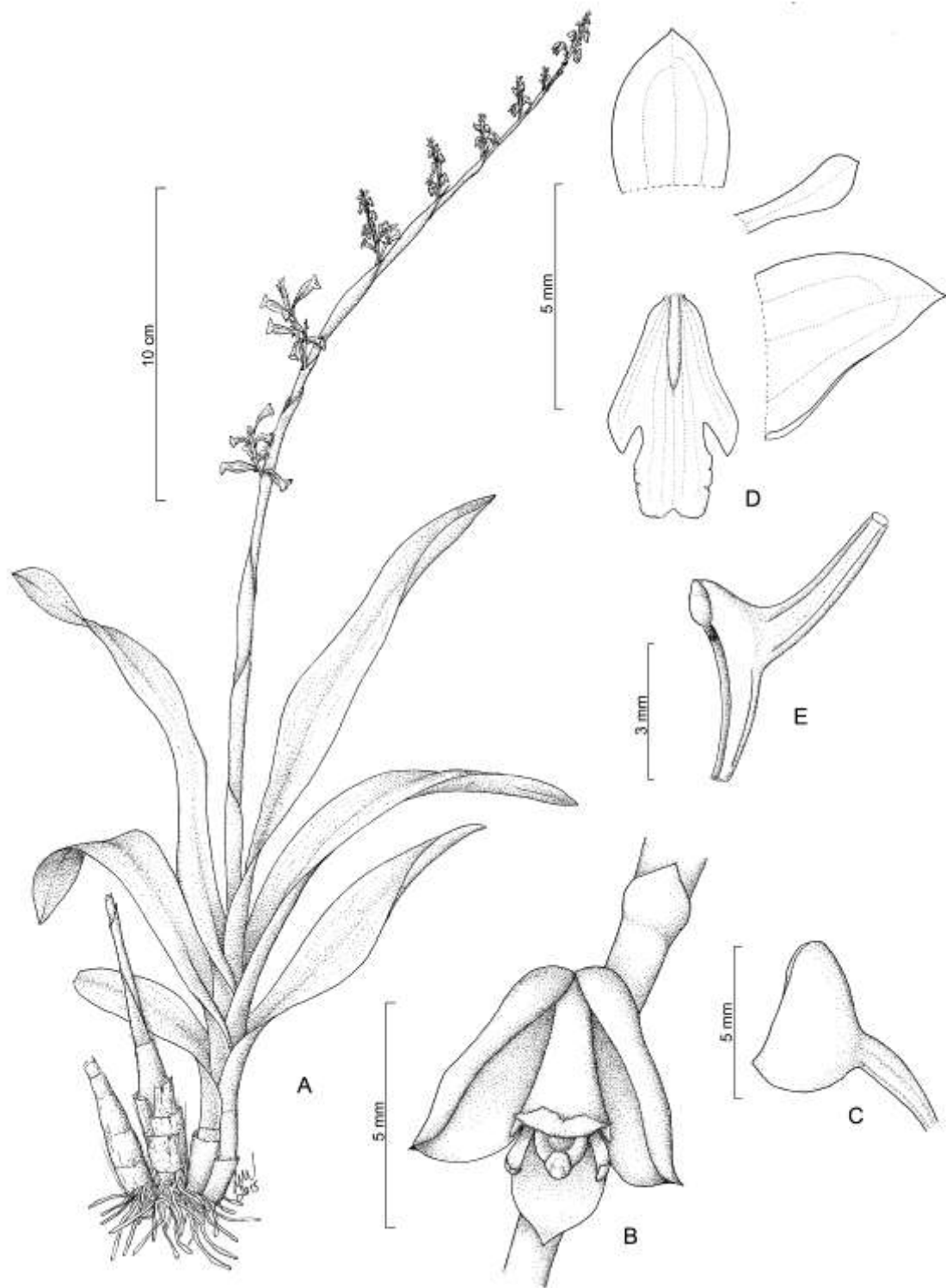


Figura 4: *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay & Sweet. A: Visão geral da planta. B e D: Flor. C: Botão floral. E: Coluna. Autor: Luiz Menini Neto.

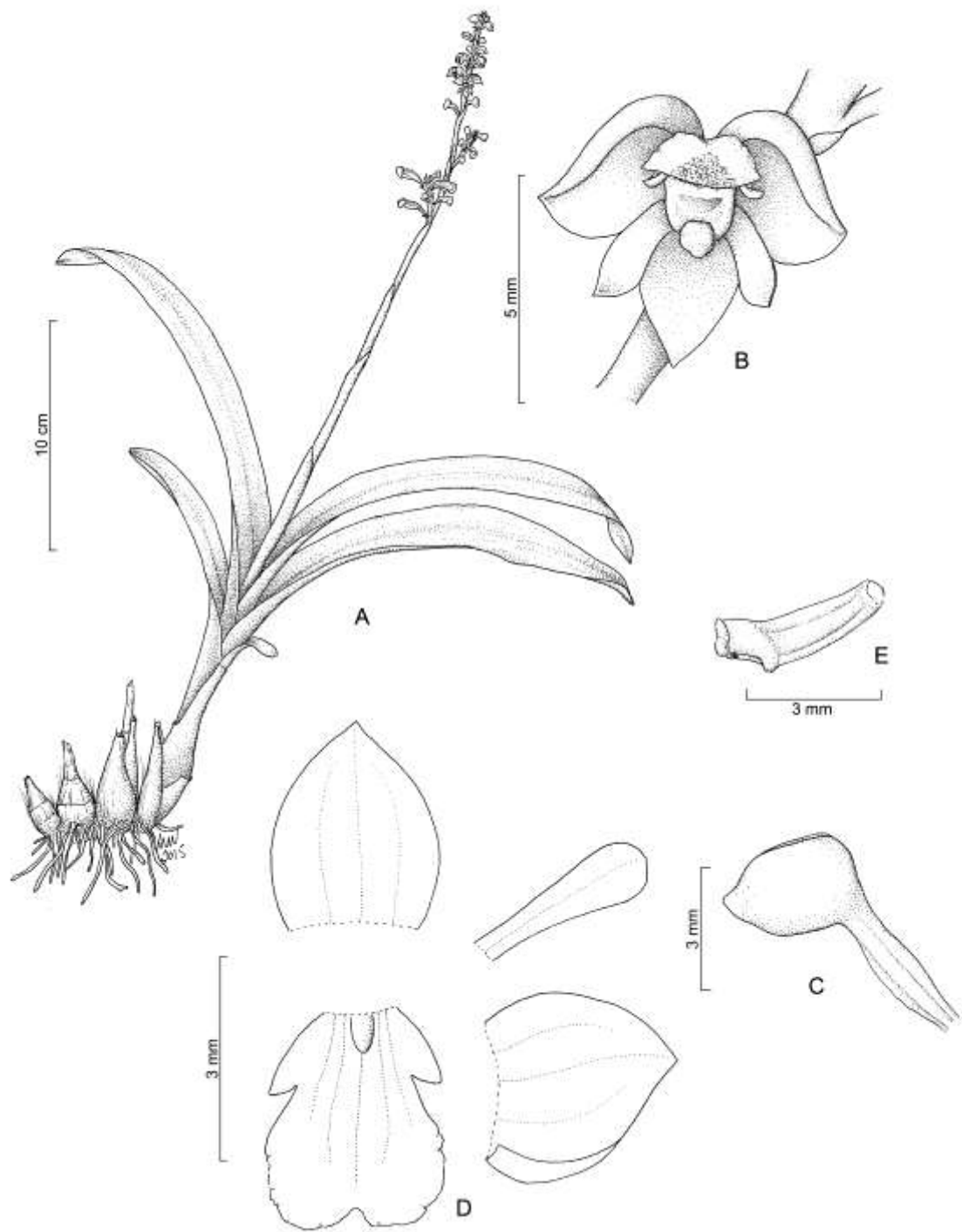


Figura 5: *Polystachya estrellensis* Rchb.f. A: Visão geral da planta. B e D: Flor. C: Botão floral. E: Coluna. Autor: Luiz Menini Neto.

1.5. CONCLUSÃO

A utilização de poucos genes plastidiais na inferência filogenética de *Polystachya* e de diferentes métodos de análise (inferência bayesiana e máxima parcimônia) mostraram diversos pontos conflituosos nas relações históricas entre as espécies. Mesmo com a inclusão de novos terminais a grande politomia que envolve *P. concreta* e *P. estrellensis*, espécies de interesse para este estudo, permanece irresoluta.

Mesmo possuindo tamanho do genoma semelhante e baixo nível de diferenciação genética, considerando as regiões do DNA que foram analisadas é possível distinguir morfologicamente *P. concreta* e *P. estrellensis*. Ademais, além dos tetraploides, na politomia supracitada há um terminal diplóide.

Considerando os resultados apresentados, o uso de poucos genes não foi eficiente na demonstração das relações evolutivas entre as espécies. Uma hipótese filogenética mais robusta pode ser alcançada com a utilização de uma nova ferramenta capaz de acessar toda a heterogeneidade da árvore de genes para estimar a filogenia das espécies. Esta nova abordagem é mostrada no Capítulo 2, intitulada “Sequenciamento paralelo em massa e sua utilidade na resolução de nós difíceis em *Polystachya* Hook.”.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V. T.; Barberena, F. F. V. A. & Fraga, C. N. 2010. Orchidaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB012071>).
- Brenan, J. P. M. (ed.). 1954. Plants collected by the Vernay Nyasaland expedition of 1946. Mem. New York Bot. Gard. 9: 1–132.
- Cameron, K. M. 2001. An expanded phylogenetic analysis of Orchidaceae using three plastid genes: *rbcL*, *atpB*, and *psaB*. P. 104 in: Botany 2001 Abstracts. St. Louis: Botanical Society of America.
- Crawford, D. J; Lowrey, T. K; Anderson, G. J; Bernardello, G.; Santos-Guerra, A.; Stuessy, T. F. 2009: Genetic diversity in Asteraceae endemic to oceanic islands: Baker's Law and polyploidy. In Syst Evol Biogeogr Compos. Edited by Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Bayer RJ. Vienna: International Association for Plant Taxonomy, 2009:139–151
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L. & Freudenstein, J. V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. Pp. 69–89 in: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L. & Cribb, P.J., (eds.), Orchid conservation. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo).
- Cribb, P. J. 1978. Studies in the genus *Polystachya* (Orchidaceae) in Africa. Kew Bull. 32: 743–766.
- Darriba, D.; Taboada, G. L; Doallo R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8), 772.
- Degnan, J. H & Rosenberg, N. A. 2009. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. Trends in Ecology and Evolution, 24(6): 332-340.
- deWet, J. M. J. 1980. Origins of polyploids. In Polyploidy-Biological Relevance, ed.WHLewis, pp. 3-15, New York: Plenum Press

- Doležel, J. 1997. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, 38: 285-302.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Dressler, R.L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the Orchid family*. Portland: Dioscorides Press.
- Fan, Y.; Wu, R.; Chen, M.-H; Kuo L.; Lewis P. O. 2011. Choosing among partition models in Bayesian phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.*, 28(1): 523-532.
- Freudenstein, J. & Rasmussen, F. 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? A cladistic analysis. *Amer. J. Bot.* 86: 225–248.
- Freudenstein, J. V.; Harris, E. M. & Rasmussen, F. N. 2002. The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the Vandoid complex. *American Journal of Botany*, 89: 1747-1755.
- Galbraith DW, Lambert GM, Macas J, Dolež'el J. 2002. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean PN, Dressler LG, Rabinovitch PS, Stewart CV, Tanke HJ, Wheelless LL, eds. *Current protocols in cytometry*. New York: John Wiley & Sons, 7.6.1–7.6.22.
- Guindon S and Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Hegarty, M. & Hiscock, S. J. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. *Current Biology*, 18 (10).
- Heled, J. & Drummond, A. J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol Biol Evol*, 27 (3): 570-580.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J. P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310–2314.

- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-5.
- Katoh, Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780.
- Kraenzlin, F. 1926. Monographie der Gattung *Polystachya* Hook. *Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih.* 39: 1–136.
- Kubatko, L. S. & Degnan, J. H. 2007. Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Syst. Biol.*, 56:17–24.
- Linder, H. P & Barker, N. P. 2014. Does polyploidy facilitate long-distance dispersal? *Ann Bot*, 113 (7): 1175-1183.
- Matioli, S. R. & Fernandes, F. M. C. 2012. *Biologia Molecular e Evolução*. 2ª Edição, Ribeirão Preto: Holos Editora, 256 p.
- McCormack, J. E.; Hird, S. M.; Zellmer, A. J.; Carstens, B. C. & Brumfield, R. T. 2013. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 526-538.
- Muthamia, Z. K.; Nyende, A. B.; Mamati, E. G.; Ferguson, M. E. & Wasilwa, J. 2014. Determination of ploidy among Yam (*Dioscorea* spp.) landraces in Kenya by flow cytometry. *African Journal of Biotechnology*, 13 (3): 394-402.
- Mytnik-Ejsmont, J. 2011. A monograph of the subtribe *Polystachyinae* Schltr. (Orchidaceae). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdanskiego, Gdansk.
- Otto, S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, 131:452-462.
- Pansarin, E. R. & Amaral, M. C. E. 2006. Biologia reprodutiva e polinização de duas espécies de *Polystachya* Hook. no Sudeste do Brasil: evidência de pseudocleistogamia em *Polystachyaeae* (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 29 (3): 423-432.
- Peraza-Flores, L. N.; Fernández-Concha, G. C. & Romero-González, G. A. 2011. Taxonomic notes in American *Polystachya* (Orchidaceae): the identity of *P.*

- foliosa* (Hook.) Rchb.f. and the reestablishment of *P. caracasana* Rchb.f. The Journal of the Torrey Botanical Society, 138(4):366-380.
- Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. (eds.) 2005. Genera Orchidacearum, vol. 4, Epidendroideae, part 1. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. A.; Rasmussen, F. N. (Eds.). 2009. Genera Orchidacearum. Oxford: Oxford University Press. v. 5: Epidendroideae (part two). 585p.
- Rupp, B. 2008. Genome size and molecular phylogeny of selected *Polystachya* species (Orchidaceae). Diploma thesis, University of Vienna.
- Rupp, B; Samuel, R; Russell, A; Temsch, E. M.; Chase, M. W. & Leitch, I. J. 2010. Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its relationships to epidermal characters. Botanical Journal of the Linnean Society, 163: 223-233.
- Russell, A; Samuel, R.; Klejna, V.; Barfuss, M.H.J; Rupp, B. & Chase, M.W. 2010 (a). Reticulate evolution in diploid and tetraploid species of *Polystachya* (Orchidaceae) as shown by plastid DNA sequences and low-copy nuclear genes. Annals of Botany, 106: 37–56
- Russell, A.; Samuel, M. R.; Rupp, B.; Barfuss, M. H. J; Šafran, M.; Besendorfer, V. & Chase, M. W. 2010 (b). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae; Vandaeae; Orchidaceae): evidence from plastid DNA sequence data. Taxon, 59 (2): 389-404.
- Russell, A.; Samuel, R.; Bogarín, D.; Fernando, S.; Wijesundera, S.; Klejna, V. & Chase, M. W. 2011. Genetic variation and phylogenetic relationships of a pantropical species group in *Polystachya* (Orchidaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 165: 235–250.
- Schifino-Wittmann, M. T. 2001. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. Ciência Rural, 31: 897-902.
- Soltis, D. E. and P. S. Soltis. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. Critical Reviews in Plant Sciences, 12: 243-273.

- Soltis, P. S. & Soltis, D. E. 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60: 56-88
- Summerhayes, V. S. 1942. African orchids: XII. *Bot. Mus. Leafl.* 10: 257-299.
- Summerhayes, V. S. 1947. African orchids: XVII. *Kew Bull.* 2: 123-133.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiński, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Van den Berg, C., Goldman, D. H., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Cameron, K. M. & Chase, M. W. 2005. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.*, 92: 613-624.
- Walker, D. J.; Moñino, I.; González, N. F. & Correal, E. 2005. Determination of ploidy and nuclear DNA content in populations of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147: 441-448.
- Xie, W.; Lewis, P.O.; Fan, Y.; Kuo, L. & Chen, M-H. 2011. Improving Marginal Likelihood Estimation for Bayesian Phylogenetic Model Selection. *Syst. Biol.*, 60 (2):150-160.
- Yang, Z. & Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews*, 13: 303-314.

CAPÍTULO 2

**SEQUENCIAMENTO PARALELO EM MASSA E SUA UTILIDADE NA
RESOLUÇÃO DE INCONGRUÊNCIAS FILOGENÉTICAS EM *Polystachya***

Hook.

2.1. INTRODUÇÃO

O objetivo da sistemática filogenética é reconstruir e detalhar a grande árvore da vida. Para isso, o conjunto de metodologias usadas busca reunir dados de caracteres para reconstruir o processo evolutivo do grupo em estudo (Amorim 1997). As sequências de DNA são consideradas grandes provedoras da informação utilizada nas abordagens filogenéticas. Além disso, exercem função conectora entre disciplinas de grandes áreas das ciências biológicas, como a genômica e a ecologia molecular (Edwards 2009).

O crescente avanço das técnicas de acesso e sequenciamento do DNA, bem como o desenvolvimento de algoritmos cada vez mais poderosos, permitiu aos pesquisadores vislumbrarem a substituição das árvores geradas a partir de um ou poucos genes, por árvores construídas a partir de centenas deles (Edwards 2009). O aperfeiçoamento da técnica de sequenciamento paralelo em massa – ou Next Generation Sequencing (NGS) tem permitido o aumento da quantidade de dados disponíveis para pesquisas biológicas, como seu uso para estudos de genomas e transcriptomas de espécies que possuem ou não seus genomas sequenciados (Bräutigam & Gowik 2010). Em outras palavras, as aplicações do NGS podem abarcar projetos de ressequenciamento genômico, seleção de regiões de interesse através da abordagem do *target sequencing*, captura de informações do transcriptoma de um organismo e montagem *de novo* de um genoma (Mardis 2008; McCormack 2013).

O NGS é um processo de sequenciamento de DNA que diferentemente do método Sanger, é capaz de processar milhões de leituras de sequências de DNA (McCormack 2013). Ainda comparando-se os dois métodos, o sequenciamento em larga escala utilizando o método tradicional requer a subclonagem dos ácidos nucleicos em vetores e sua amplificação nos hospedeiros. Ao contrário, o uso da tecnologia NGS evita esse passo, contribuindo para que esta tecnologia seja mais econômica e de rápida execução (Bräutigam & Gowik 2010).

A despeito do seu óbvio potencial, ainda são poucos os trabalhos que usam o NGS para a obtenção de dados nas pesquisas sobre a biologia de plantas (Cronn *et al.* 2012; Carstens *et al.* 2013; Eaton & Ree 2013) provavelmente resultado do foco

predominante em organismos não modelos, da necessidade do uso de muitos indivíduos por espécie e ausência de protocolos bem estabelecidos (McCormack 2013).

Com mais de 25 mil espécies, Orchidaceae é considerada a maior família das Angiospermas (Dressler 1990). Estudos recentes baseados em registros fósseis disponíveis, demonstram uma origem relativamente recente (cerca de 77 Ma, no Cretáceo tardio) (Gustafsson *et al.* 2010). Características únicas no processo reprodutivo, aliadas à ampla diversidade de formas e êxito na colonização de diferentes *habitats* são os responsáveis pelo sucesso evolutivo das Orchidaceae (Dressler 1990). Todas essas características fazem desta família uma ótima ferramenta para diversos campos de estudos. Mesmo representando uma grande oportunidade de estudos evolutivos e biogeográficos, poucos dados genômicos foram gerados para Orchidaceae (ex. Hsiao *et al.* 2006; Tsai *et al.* 2006; Hsu *et al.* 2011).

Polystachya se destaca por possuir ampla faixa de distribuição geográfica, fato pouco comum entre os gêneros de Orchidaceae (Pridgeon *et al.* 2005), incluindo espécies pantropicais e com distribuição transatlântica. A África é o principal centro de diversidade (Dressler 1993), possuindo cerca de 250 espécies distribuídas em 28 países (Russell 2010 b). No Brasil o gênero está representado por 13 espécies, das quais 10 são endêmicas ao país (Barros *et al.* 2010).

Apoiados no potencial de estudos do gênero, trabalhos recentes revelaram importantes aspectos citológicos, evolutivos e biogeográficos de *Polystachya* (Rupp *et al.* 2010; Russell *et al.* 2010 a,b; 2011). Os estudos filogenéticos moleculares realizados até o momento incluíram cerca de 35% dos táxons e uma parte relativamente pequena do genoma, revelando uma acentuada incongruência entre as árvores de genes resultantes (*vide* Capítulo 1).

O objetivo deste trabalho foi aplicar técnicas mais robustas de acesso aos dados genômicos e contribuir para a resolução de algumas incongruências encontradas no gênero, podendo refletir em novas interpretações sobre a história evolutiva e biogeográfica do grupo.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia usada neste trabalho consistiu basicamente na construção de bibliotecas genômicas, sua hibridação com sondas de RNA, desenhadas a partir de sequências disponíveis de uma espécie relacionada, e posterior sequenciamento deste produto. Foram incluídos na análise 48 indivíduos (Tabela 4), dos quais 15 foram coletados em diferentes localidades no Brasil continental e três indivíduos coletados na Ilha da Trindade. O DNA destas amostras foi extraído utilizando a metodologia descrita no primeiro capítulo.

Os outros 33 indivíduos incluídos na análise consistem em amostras de DNA cedidas pela Universidade de Viena e pelo banco de DNA do *Royal Botanic Gardens*, KEW. Os indivíduos utilizados formam o Clado III definido em Russell *et al.* (2010b) adicionando *P. tessellata*, suposta espécie sinônima de *P. concreta*. Como grupos externos foram escolhidas *P. bicolor* (= *P. rosea*) e *P. melanantha*.

2.2.1. Desenho das sondas de captura do DNA

Dada à inexistência do sequenciamento completo do DNA genômico de *Polystachya*, a espécie *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* (NC_007499.1) foi utilizada como referência para o desenho das sondas de captura. Isso foi possível, pois o kit de captura do DNA utilizado (MyBaits) é capaz de suportar uma diferença maior que 5% entre as sequências da sonda e as sequências alvo. Em outras palavras, a sonda de captura pode ser desenhada a partir de uma espécie diferente da espécie que está sendo estudada. A sequência completa do cloroplasto de *P. aphrodite* subsp. *formosana* foi separada em blocos com 360 pb (os blocos de referência), intervalados com blocos do mesmo tamanho sempre que possível. Sequências com mais de sete bases repetidas foram evitadas dentro do bloco de referência. Ao final, as sequências do cloroplasto de *P. aphrodite* subsp. *formosana* somaram 63.720 bp que foram reunidos em um único arquivo FASTA e enviados para a empresa MYcroarray para confecção das sondas.

2.2.2. Sonicação e Preparação das bibliotecas genômicas

A sonicação é um processo mecânico de fragmentação do DNA. Para esta etapa são necessários 130 µL de DNA de cada amostra e concentração total mínima de 500 ng. As amostras utilizadas que possuíam volume inferior ao indicado foram completadas com tampão EB. O DNA genômico foi fragmentado aleatoriamente usando o equipamento Covaris S220 (Covaris, Woburn, Massachusetts, USA). O objetivo da fragmentação aleatória é cobrir uniformemente todo o genoma.

A montagem da biblioteca genômica consiste em incorporar aos fragmentos de DNA pequenas sequências artificiais conhecidas, chamadas de adaptadores ou *barcodes*, conforme demonstrado na figura 6.

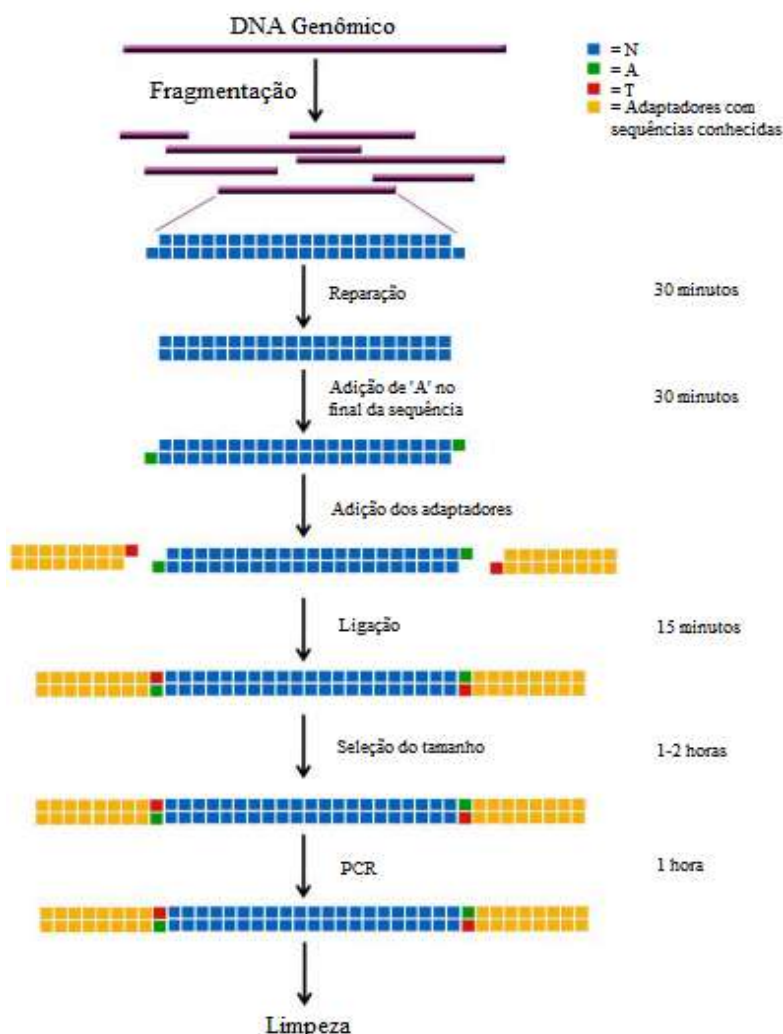


Figura 6: Metodologia utilizada na preparação das bibliotecas genômicas e o tempo médio gasto em cada etapa. A biblioteca genômica é montada utilizando os kits NEXTflex™ DNA Sequencing Kit e NEXflex™ Barcodes. Fonte: BIOO Scientific, Austin, Texas, USA, com modificações.

A etapa de reparação dos fragmentos é necessária para corrigir aquelas sequências cujo final não termina em um par de bases. Após, uma adenina é adicionada ao final das sequências para que os adaptadores possam ser ancorados ao fragmento. Os adaptadores são então ligados aos fragmentos através da base complementar (timina) (Figura 6). A função dos adaptadores é identificar os fragmentos aos quais estão ligados para que após o sequenciamento, as amostras possam ser separadas computacionalmente. Os adaptadores foram incorporados ao DNA fragmentado usando os kits NEXTflex™ DNA Sequencing Kit e NEXflex™ Barcodes (BIOO Scientific, Austin, Texas, USA). O manual do usuário traz em detalhe os reagentes e volumes necessários em cada etapa. O kit usado neste trabalho possuía 48 adaptadores distintos, ou seja, um adaptador exclusivo para cada amostra usada.

Fragmentos entre 300 e 400 pb foram selecionados (etapa seleção do tamanho – Figura 6) usando o kit Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter). Esta técnica consiste em misturar os fragmentos de DNA já com os adaptadores, à micro esferas. Ao final, o DNA está ligado à esfera pelo adaptador e também ao *primer* fornecido por esse kit. A biblioteca genômica foi então amplificada (etapa de PCR – Figura 6) para gerar milhares de cópias de cada fragmento e aumentar a eficácia do sequenciamento. Foi usado o seguinte programa: 98°C, 2 minutos; 14 ciclos (98°C, 30 segundos; 65°C, 30 segundos; 72°C, 60 segundos); 72°C, 4 minutos. Os produtos do PCR foram purificados utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

A etapa de montagem das bibliotecas exige que o DNA genômico tenha uma concentração mínima de 500 ng/μL. As concentrações do DNA genômico antes e após a sonicação e da biblioteca amplificada foram medidas no NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Tabela 4).

2.2.3. Enriquecimento e sequenciamento

O método de enriquecimento consiste na captura seletiva de regiões genômicas de uma amostra de DNA antes do sequenciamento (Mamanova *et al.* 2010). O enriquecimento foi realizado com o MYBaits target enrichment system (MYcroarray, Ann Arbor, Michigan), seguindo as instruções contidas no manual do usuário. Assim

Tabela 4: Lista das espécies analisadas com concentração e pureza do DNA antes e após a montagem da biblioteca genômica. *Espécies excluídas da análise devido à baixa qualidade no sequenciamento.

ESPÉCIE	REGISTRO	VALORES INICIAIS DAS AMOSTRAS			VALORES PÓS-MONTAGEM DAS BIBLIOTECAS GENÔMICAS	
		Concentração (ng/uL)	Pureza 260/280	Volume	Concentração (ng/uL)	Pureza 260/280
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 255	29,8	1,81	65	33,7	1,9
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 255	17,8	2,06	90	26	1,54
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 255	11,9	1,82	75	35	1,86
<i>P. cf. estrelensis</i>	N.L.Abreu 253	12,8	1,77	65	18,7	1,84
<i>P. cf. estrelensis</i>	N.L.Abreu 253	22,4	1,87	70	21	1,96
<i>P. cf. estrelensis</i>	N.L.Abreu 253	28,2	1,79	70	26,3	1,96
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 252	25,4	1,91	70	29,3	1,98
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 252	14,6	1,79	70	22,4	2,02
<i>P. concreta</i>	N.L.Abreu 254	39,2	1,92	75	17,2	1,92
<i>P. concreta</i>	N.L.Abreu 254	33,6	1,96	75	31,9	1,9
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 256	27,8	1,61	90	20,4	2,05
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 256	23,8	1,81	75	23,1	1,93
<i>P. estrelensis</i>	N.L.Abreu 256	22,3	1,68	90	28	1,97
<i>P. concreta</i>	N.L.Abreu 251	18	1,78	70	29,9	1,97
<i>P. concreta</i>	N.L.Abreu 251	8,5	1,52	130	38,3	1,9
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 250	10,1	1,64	130	30	1,88
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 250	12,5	1,64	130	30	1,83
<i>P. estrellensis</i>	N.L.Abreu 250	10,3	1,48	130	34,7	1,84
<i>P. tsinjoarivensis 2</i>	HBV FS4182	22,2	1,75	13	17,2	1,64
<i>P. concreta6</i>	A. Russell 40 (YA)	35	1,82	8	15	1,75
<i>P. odorata 2</i>	A. Russell 42 (YA)	36,9	1,91	13	26,2	1,91
<i>P. concreta 5</i>	HBV ORCH 066004	21,9	1,53	6	9,8	1,9
<i>P. modesta</i>	HBV ORCH 05165	56,8	1,35	13	31,7	1,93
<i>P. foliosa 2</i>	HBV ORCH 07082	30,2	1,73	8	18,6	1,79
<i>P. concreta 8</i>	HBV ORCH 07278	26	1,78	13	32,4	1,85
<i>P. concreta 9</i>	HBV "Chase & Samuel 1"	34	1,82	13	30	1,85
<i>P. concreta 10</i>	HBV ORCH 07417	23,7	1,83	13	30,4	1,86
<i>P. hundertii 1</i>	Fischer&Sieder FS2079 (WU)	116,3	1,82	13	29,4	1,77
<i>P. oreocharis 1</i>	Fischer&Sieder FS2082 (WU)	58	1,74	13	30,2	1,87
<i>P. hundertii 2</i>	Fischer&Sieder FS3017 (WU)	35,1	1,93	11	34,2	1,89
<i>*P. oreocharis 2</i>	Fischer&Sieder FS3152 (WU)	20,2	1,82	13	10,5	1,8
<i>*P. cornigera</i>	Fischer&Sieder FS3208 (WU)	22,2	1,76	11	7,7	1,58
<i>*P. tsinjoarivensis1</i>	Fischer&Sieder FS3209 (WU)	19,3	1,83	13	9,3	1,79
<i>*P. concreta 4</i>	Fischer&Sieder FS3210 (WU)	21	1,81	13	9,4	1,63
<i>*P. pinicola</i>	HBV ORCH 06606	31	1,11	7	9,2	1,98
<i>*P. paniculata 2</i>	L. Pearce 27 (YA)	56,1	1,4	8	8,1	1,98
<i>*P. concreta</i>	Kew 17854	70	1,65	67	9,6	1,6
<i>*P. henrici</i>	Kew 17856	22	1,52	56	7,7	2,04
<i>P. odorata</i>	Kew 17857	33,7	1,56	58	46,8	1,8
<i>P. tessellata</i>	Kew 17859	176,2	1,1	58	32,7	1,89
<i>P. tessellata</i>	Kew 17860	216,1	1,1	49	33,3	1,93
<i>P. melanatha</i>	Kew 17954	207,2	0,94	50	12,2	1,8
<i>P. steudneri</i>	Kew 17956	10,6	1,45	58	33,5	1,87
<i>P. eurychila</i>	Kew 17963	207,6	0,94	85	13,7	1,98
<i>P. golungensis</i>	Kew 17966	104,7	1,14	115	26,1	1,88
<i>P. bicolor</i>	Kew 25884	20,1	1,51	50	31,7	1,93
<i>P. dolichophylla</i>	Kew 25886	108,9	1,05	55	30,3	1,89
<i>P. foliosa</i>	Kew 25887	14,7	1,58	56	31,8	1,96

como para a montagem das bibliotecas genômicas, o manual do usuário dos kits utilizados nesta etapa trazem em detalhe todos os passos das reações.

Antes de iniciar a fase de enriquecimento, quantidades equimolares de cada biblioteca amplificada foram reunidas em seis reações contendo cada uma oito amostras indexadas. Neste passo, foram utilizadas amostras de DNA com concentração de 400ng/ μ L. Os volumes necessários foram secos no aparelho SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, USA) e o DNA foi ressuscitado em 6 μ L de água.

A primeira etapa do processo de enriquecimento é desnaturar o DNA para obter o DNA de cadeia simples. Nesta mesma reação, ocorre a hibridação das fitas de DNA de cadeia simples com as sondas de RNA pré-desenhadas. Tais sondas são complementares às sequências alvo de DNA. As sondas permanecem estocadas à -80°C e sua confecção está descrita no item 2.2.1. Assim que as sequências de DNA estão ligadas às sondas de RNA é possível realizar a captura das sequências alvo (as sequências de DNA). Para tal, são utilizadas microesferas que possuem afinidade elevada com as sondas. Ao final da captura, o DNA está ligado aos adaptadores, à sonda de RNA e à microesfera de captura. A recuperação dos fragmentos de DNA é feita com separação magnética e após a lavagem das sondas, restam apenas os fragmentos de DNA (Figura 7). As sondas foram recuperadas com o Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway).

Para aumentar concentração do DNA, 14 ciclos de PCR foram realizados para cada reação de hibridação usando Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent, Waldbronn, Germany). Foi utilizado o seguinte programa: 98°C, 30"; 14 ciclos (98°C, 20"; 60°C, 30"; 72°C, 60"), 72°C, 5'. O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq para Illumina (San Diego, California, USA) no Genomics Core Facility da Universidade de Gotemburgo, Suécia.

2.2.4. Edição das sequências

As amostras sequenciadas foram editadas no programa CLC Genomics (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Primeiramente, os adaptadores de Illumina (que contêm os barcodes) foram removidos das sequências e as sequências de baixa qualidade foram excluídas. Em seguida, as sequências foram mapeadas através de uma sequência de

referência e convertidas em formato FASTA. As sequências de referência foram obtidas usando o programa SAMTools (Li *et al.* 2009). As sequências homólogas foram então alinhadas usando o programa Mafft - Multiple Sequence Alignment Software Version 7 (Katoh & Standley 2013) e posteriormente refinadas no programa Geneious Pro (Biomatters).

A última etapa da edição consiste em realizar a anotação da região que será analisada. Para isso, as 48 amostras sequenciadas neste estudo foram alinhadas com o genoma do cloroplasto de *Erycina pusilla* disponível no GenBank (JF746994.1).

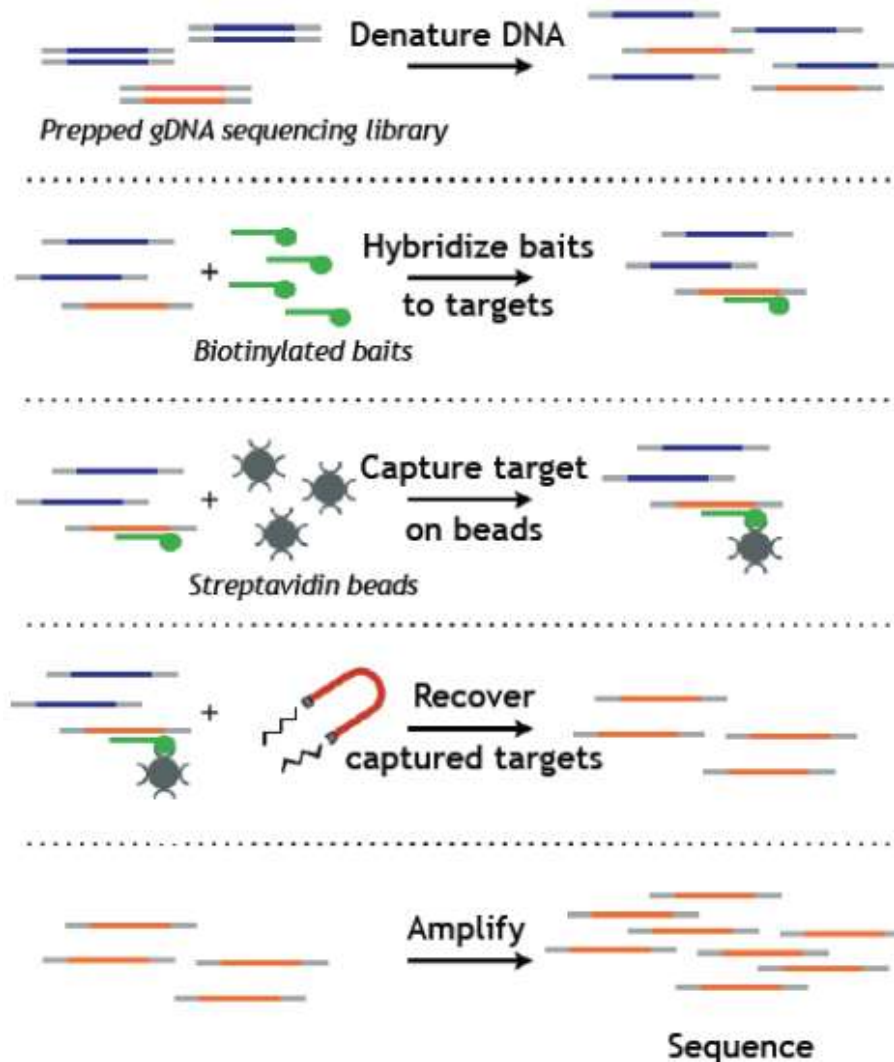


Figura 7: Metodologia usada para o enriquecimento da sequência. O enriquecimento foi realizado com o MYBaits target enrichment system e sondas foram recuperadas com o Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1. Fonte: MYcroarray, Ann Arbor, Michigan.

2.2.5. Análise filogenética

As sequências alinhadas foram particionadas em 104 genes, seis pseudogenes e dois arquivos com íntrons concatenados, um deles contendo íntrons com estrutura secundária e o outro com sequências intergênicas. Os arquivos contendo os íntrons foram submetidos ao programa trimAl v1.2 (Capella-Gutiérrez *et al.* 2009) permitindo diferentes configurações de exclusão de *gaps*. Os modelos evolutivos para o arquivo gerado no trimAl foram obtidos através do jModelTest-2.1.4 (Darriba *et al.* 2012), aplicando-se o modelo designado pelo Akaike Information Criterion (AIC) em *default*. O modelo evolutivo com maior valor do parâmetro alfa da distribuição gama foi selecionado. Os modelos da evolução molecular de todos os genes também foram obtidos no jModelTest-2.1.4. Pseudogenes pobremente alinhados com a referência foram excluídos da análise.

A análise filogenética foi estimada por inferência bayesiana, com o programa MrBayes 3.2.3 (Ronquist *et al.* 2011). O suporte dos clados foi calculado usando probabilidades posteriores bayesianas estimadas como a frequência dos clados nas árvores retidas após 25% de *burn-in*. O programa Tracer v1.6 (Rambaut & Drummond 2007) foi utilizado para inspecionar visualmente a convergência e estacionariedade das corridas e obter os tamanhos efetivos das amostras (ESS) para todos os parâmetros do modelo.

A análise de *stepping-stone* (SS), implementada no programa MrBayes, foi realizada para determinar o melhor particionamento dos dados. Esta análise foi descrita recentemente e tem mostrado vantagens ao estimar com maior precisão a probabilidade marginal (Xie *et al.* 2011). A probabilidade marginal é comumente usada para comparar diferentes modelos evolutivos em filogenias bayesianas e para calcular o fator de Bayes, que por sua vez, determina o melhor caminho para a partição dos dados (Fan *et al.* 2011; Xie *et al.* 2011). Os dados foram analisados usando as seguintes partições: todos os genes concatenados como uma única partição, íntrons com estrutura secundária + tRNA e regiões intergênicas + pseudogenes (ndhB).

2.3. RESULTADOS

A aplicação da tecnologia NGS permitiu a captura de regiões codificantes e não-codificantes ao longo de todo o genoma do cloroplasto. Foram sequenciados cerca de 132kb, divididos em 104 genes, seis pseudogenes, além das regiões com sequências intergênicas e íntrons com estrutura secundária. Destes, apenas cinco pseudogenes foram excluídos da análise, pois não se alinharam perfeitamente com a referência. Ao final do sequenciamento, oito das 48 amostras utilizadas na análise mostraram baixa qualidade nos resultados do sequenciamento e foram excluídas (Tabela 4). Em comum, as sete amostras possuíam baixa concentração de DNA, pureza e volume iniciais, podendo estas serem as causas da baixa qualidade do sequenciamento. O número total de sítios polimórficos foi 338 para as regiões codificantes, 390 para íntrons com estrutura secundária e de 1.845 para regiões com sequências intergênicas.

A filogenia realizada foi capaz de resolver as relações de parentesco entre os grupos do grande clado selecionado para este estudo, apresentando também altos valores de suporte (Figura 8). O primeiro clado que se divergiu é composto por *P. tsinjoarivensis*, *P. oreocharis*, *P. eurychila*, e *P. humbertii* (Bayesian posterior probability, Bpp = 1). O segundo clado que se divergiu inclui *P. concreta* (amostra coletada na Ilha de Réunion) e *P. golungensis* (Bpp=1), seguidas por *P. steudneri* (Bpp=1), *P. dolichophylla* (Bpp=1) e *P. odorata* (Bpp=1). O restante dos clados incluem representantes de *P. concreta*, *P. bicolor*, *P. tessellata*, *P. foliosa*, *P. modesta* e *P. estrellensis*. Conforme observado nas análises anteriores com o gênero, *P. concreta* pode ser observada em vários pontos da árvore.

P. modesta (amostra coletada em Comoros), *P. tessellata* (amostra coletada em Madagascar) e *P. concreta* (amostras coletadas em Ilhas Maurício e Camarões) (Bpp=0,98) formam o grupo irmão do clado que contém todas as amostras coletadas no Brasil (Bpp=1) com 1 (Bpp) de suporte.

Com relação aos acessos brasileiros, *P. concreta* e *P. estrellensis* estão localizadas em clados irmãos na árvore filogenética. *P. concreta* aparece mais próxima à *P. foliosa* (Bpp=1) enquanto todos os acessos de *P. estrellensis* formam um grupo com alto grau de suporte (Bpp=0,98).

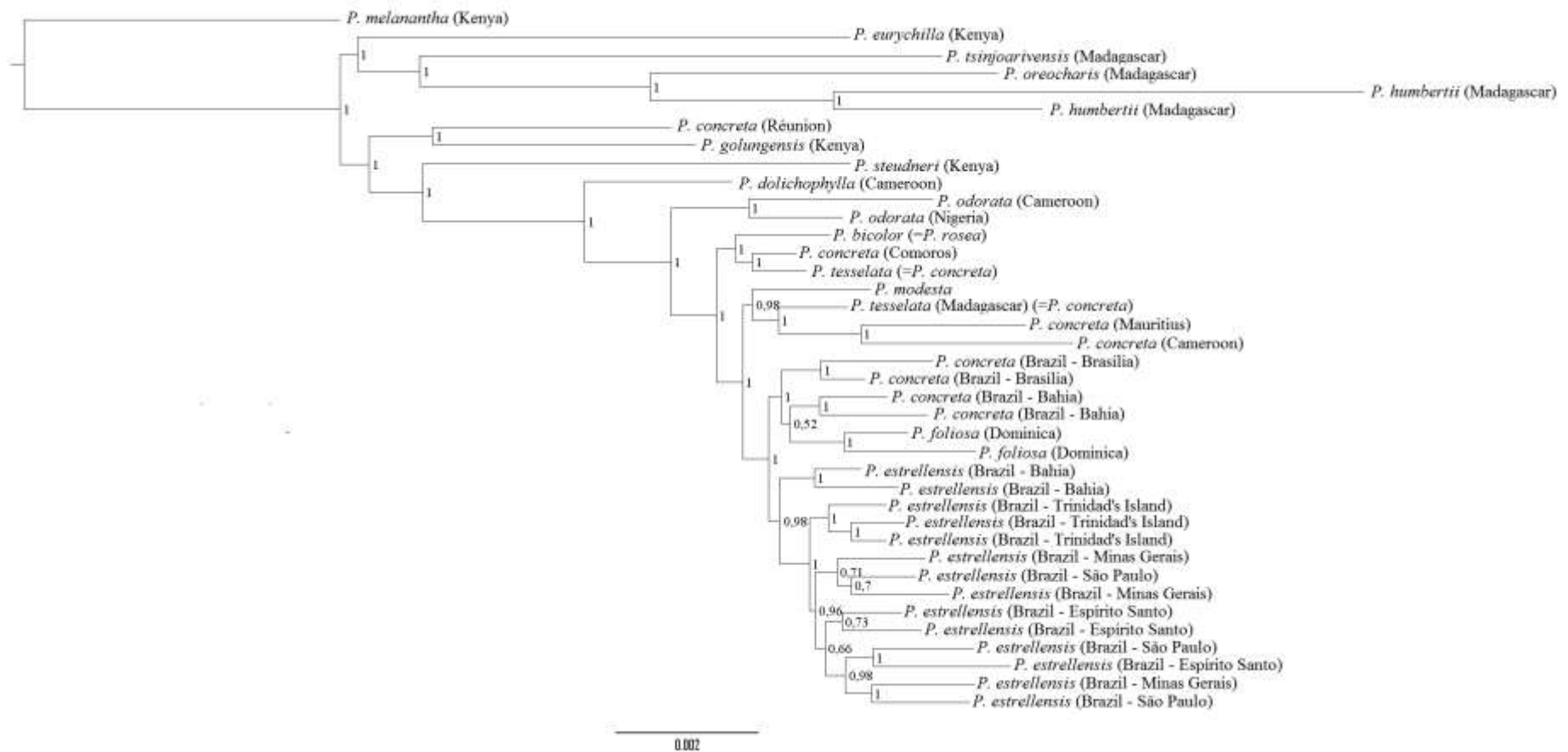


Figura 8: Relações filogenéticas de um clado de *Polystachya* baseadas na inferência bayesiana e na análise do genoma quase completo do cloroplasto. O comprimento dos ramos é proporcional ao número esperado de substituições por sítio.

2.4. DISCUSSÃO

2.4.1. *Next Generation Sequencing e captura de sequências: eficiência da metodologia utilizada*

O cpDNA codifica aproximadamente 120 genes (Maliga 2002), que podem ser divididos em 3 grupos: genes para expressão gênica no próprio cloroplasto, genes que codificam componentes do aparato fotossintético e genes hipotéticos com função ainda desconhecida (Rochaix 1997). Hartl & Clark (1997) estimaram que o cpDNA pode variar de 135 kb à 160 kb, esta diferença foi ampliada para 107 a 217 kb com o sequenciamento e disponibilização de novos dados para o cloroplasto (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>, último acesso em fevereiro, 2015).

A utilização da tecnologia NGS permitiu-nos aumentar a magnitude de dados disponíveis para os estudos filogenéticos, preparando o DNA genômico para conter regiões ortólogas, sem a necessidade de realizar centenas de PCRs (McCormack 2013). Este avanço já pode ser percebido nos estudos que fazem uso da tecnologia de sequenciamento de nova geração para reconstruir filogenias baseadas no genoma completo, ou quase completo, do cloroplasto (Parks *et al.* 2009; Njuguna *et al.* 2013; Huang *et al.* 2014; Molina *et al.* 2014). O uso da plataforma Illumina, aliada à captura de sequências, ou seja, captura seletiva de regiões genômicas da amostra de DNA antes do sequenciamento (Mamanova *et al.* 2010), reduz significativamente o tempo e os custos na obtenção deste conjunto de dados (Lemmon *et al.* 2012).

Por apresentar menores taxas de recombinação, o cloroplasto é um marcador de evolução lenta, sendo por isso mais bem conservado do que o genoma nuclear (Niklas, 1997). Mesmo assim, o desenvolvimento de marcadores moleculares baseados no polimorfismo encontrado nos genomas de cloroplasto tem ainda hoje grande impacto nos estudos de filogenia das principais linhagens das angiospermas (Jansen *et al.* 2007; Moore *et al.* 2007, 2010; Stull *et al.* 2013) e especificamente na filogenia de Orchidaceae (Cameron, 2005; Van den Berg *et al.* 2005; Ficher *et al.* 2007).

O uso do genoma completo do cloroplasto mostrou-se eficiente no aumento da resolução filogenética em níveis taxonômicos inferiores (Särkinen & George 2013). Utilizando 18 genomas completos de cloroplasto e cinco rascunhos (“*draft*”) da

sequência do genoma, Huang *et al.* (2014) conseguiram informação genética suficiente para reconstruir a filogenia do gênero *Camellia* (Theaceae). O mesmo resultado foi encontrado na reconstrução filogenética de *Pinus*, no qual a resolução da árvore foi aumentada acessando 37 genomas quase completos de cloroplasto (Parks *et al.* 2009).

Nossos resultados destacaram que o aumento expressivo no número de nucleotídeos pode ser uma opção eficaz na inferência da filogenia em níveis taxonômicos inferiores do gênero em questão. Embora este conjunto de dados seja promissor na formulação de hipóteses filogenéticas mais robustas, o sequenciamento completo do genoma do cloroplasto pode ser inviável para projetos de sistemática que consideram gêneros com grande número de espécies (Särkinen & George 2013), como é o caso de *Polystachya*. Neste caso, é importante saber se o aumento na resolução é consequência exclusiva do aumento do número de nucleotídeos, ou se as regiões genômicas utilizadas nos estudos anteriores são menos informativas, em média, do que o resto do genoma (Parks *et al.* 2009). Sendo a última opção a verdadeira, os genomas cloroplastidiais gerados por este trabalho podem ser utilizados no rastreamento de marcadores altamente variáveis (Ekblom & Galindo 2011) para *Polystachya* e talvez Orchidaceae. Esta abordagem já foi utilizada em Solanaceae (Daniell *et al.* 2006), Asteraceae (Timme *et al.* 2007) e Poaceae (Zhang *et al.* 2011) para identificar potenciais marcadores moleculares úteis na resolução de filogenias destas famílias.

2.4.2. Relações filogenéticas

Foram selecionadas duas espécies para compor o grupo externo, *P. bicolor* (= *P. rosea*) e *P. melananta*. Esta última espécie foi utilizada para enraizar a árvore. O posicionamento de *P. rosea* como espécie irmã de *P. concreta* (amostra coletada em Comoros) e *P. tessellata* (= *P. concreta*) não corrobora a monofilia do Clado III apresentado por Russell *et al.* (2010b), embora este e os demais cladogramas internos do gênero tenham alto grau de suporte. Os resultados aqui apresentados indicam que o aumento do número de marcadores moleculares tem potencial não somente de resolver as relações entre as espécies como também definir novos cladogramas e seções de *Polystachya*. Dentre as 15 seções de *Polystachya* (Kraenzlin 1926, Summerhayes 1942, 1947 *apud* Russell 2011 b; Brenan 1954; Cribb 1978), apenas *Isochiloides* é monofilética do ponto de vista molecular (Russell *et al.* 2010 b).

As espécies que se divergiram primeiro dentro do clado estudado são representadas por acessos africanos, enquanto as amostras coletadas no Brasil são as mais derivadas. Esses resultados são coerentes com a história de origem do gênero, que mostra que a África é o principal centro de diversidade das espécies (Dressler 1993) e provavelmente o centro de origem dos táxons, com dispersão recente ao Neotrópico (Russel 2010 a, b).

O posicionamento de *P. concreta* em diferentes clados foi atribuído às origens híbridas desta espécie (Russell *et al.* 2010 b). A alotetraploidia em *P. concreta* foi posteriormente confirmada com a análise de genes nucleares de baixa cópia (Russell *et al.* 2010 a). Eventos de hibridação interespecífica, como ocorre em *Polystachya concreta*, são também considerados fonte de troca de genomas de cloroplastos, ou introgressão. A troca de genomas do cloroplasto de uma espécie para outra é algumas vezes sugerida como explicação para as incoerências entre árvores filogenéticas baseadas em marcadores nucleares e plastidiais (Smith & Sytsma 1990; Tsitrone *et al.* 2003). Isso é verdadeiro no gênero *Populus* (Salicaceae), no qual a hibridação introgressiva teve papel significativo na evolução do gênero. Como consequência filogenias baseadas em marcadores plastidiais ou nucleares não refletem a genealogia das espécies (Smith & Sytsma 1990). O mesmo ocorre em *Nothofagus* (Nothofagaceae) e em Crassulaceae, onde eventos de troca de cloroplasto limitam as hipóteses filogenéticas baseadas em plastídeos (Mort *et al.* 2002; Acosta & Premoli 2010). Embora seja um fenômeno mais bem descrito para procariontes, a transmissão vertical é altamente significativa na evolução do genoma de organismos eucariontes (Bock 2010).

No caso de *Nothofagus*, o resultado da captura de cloroplasto é a associação dos genomas cloroplastidiais com localizações geográficas, e não com as relações taxonômicas (Acosta & Premoli 2010). Relações baseadas na localização geográfica poderiam ser exploradas como a possível explicação para a proximidade dos indivíduos de *P. concreta* coletados no Brasil com *P. estrellensis* e não com outros acessos desta espécie. Neste caso, seriam necessárias além do estudo de marcadores nucleares de uma revisão morfológica minuciosa destes táxons.

A dissimilaridade genética entre o grupo de tetraploides africanos e neotropicais foi confirmado nos trabalhos de Russell *et al.* (2010 a) e Russell *et al.* (2011), mas a delimitação de *P. estrellensis*, *P. concreta* e *P. foliosa* permaneceram incertos. Mytnik-

Ejsmont (2011) incluiu *P. estrellensis* como espécie sinônima de *P. foliosa*. De acordo com nossa análise, *P. estrellensis* deve ser considerada como espécie distinta de *P. concreta*. Além disso, a sinonimização de *P. estrellensis* e *P. foliosa* proposta por Mytnik-Ejsmont (2011) também não foi comprovada por este estudo. Na árvore apresentada, *P. foliosa* forma um grupo altamente suportado com *P. concreta* (amostras coletadas no Brasil) (Bpp=1). Por último, embora nossos resultados possam apontar para uma possível separação das *P. concreta* brasileiras e africanas, a delimitação desta espécie ainda permanece incerta, considerando que não existe uma revisão taxonômica do gênero que analise rigorosamente a variação morfológica da espécie e, que a análise de evolução reticulada realizada por Russell (2010a) não abrangeu acessos neotropicais suficientes para estas conclusões.

2.4.3. Avanços e Perspectivas futuras

A principal dificuldade no uso de sequências de DNA está em traduzir a história da diversidade destas sequências (árvores de genes e alelos) para a árvore de espécies e populações (Edwards 2009). Isto ocorre, por que nem sempre a árvore evolutiva de um dado gene coincide com a árvore das espécies que possuem este gene (Brower *et al.* 1996; Doyle 1992).

Discordâncias entre as árvores de genes e espécies podem surgir da transferência horizontal de genes, coalescência profunda, e duplicação/perda de genes (Degnan & Rosenberg 2009; Edwards 2009). Todos esses fenômenos podem resultar em diferentes topologias das árvores de genes. Além desses, a heterogeneidade no comprimento de ramo devido ao processo de coalescência, pode ser considerada como fonte adicional da heterogeneidade na árvore de genes (Edwards 2009).

O Analisador de Genoma Illumina (*Illumina Genome Analyser*) é capaz de produzir milhões de leituras curtas, sendo por isso conhecido como tecnologia de leitura curta (Bräutigam & Gowik 2010). O inconveniente dos curtos comprimentos de leitura é superado pela alta cobertura que a estratégia de amostragem de captura de sequências proporciona. Ao final do enriquecimento, as sondas podem ser emparelhadas de forma que as curtas leituras podem ser mais tarde montadas em longos contígues (McCormack *et al.* 2013). Estes por sua vez, contêm milhares de *loci* independentes, ideais para uso

na análise da árvore de espécies, através a abordagem da coalescência multi-espécies, o novo paradigma emergente na sistemática (Edwards 2009). Na prática, o uso das técnicas tradicionais de sequenciamento Sanger para acessar grande quantidade de genes torna o processo inviável tanto pelo tempo gasto como pelo elevado custo, levando-se em consideração que as filogenias normalmente tratam de muitas espécies (Mardis 2008; Bräutigam & Gowik 2010).

A abordagem da coalescência multi-espécies, exige um conjunto de métodos de modelagem, capaz de utilizar toda a heterogeneidade das árvores de genes para estimar a árvore das espécies (Heled & Drummond 2010). Existem hoje alguns métodos e programas que permitem a estimativa da árvore de espécies através deste modelo (Kubatko 2009; Kubatko *et al.* 2009; Heled & Drummond 2010; Liu 2008; Liu *et al.* 2008; Larget *et al.* 2010; Ronquist *et al.* 2012; Heled *et al.* 2013). O MrBayes, *software* utilizado neste trabalho, é um programa para a inferência Bayesiana filogenética usando cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) (Huelsenbeck & Ronquist 2001). O modelo multispecies coalescente foi agora totalmente integrado na versão 3.2 deste programa, permitindo obter a árvore de espécies a partir a inferência filogenética bayesiana (Ronquist *et al.* 2012)

O gênero *Polystachya* possui aspectos interessantes do ponto de vista citológico (possui espécies poliploides e diploides), biogeográfico (algumas espécies são amplamente distribuídas nos trópicos; em contrapartida das 13 espécies encontradas no Brasil, 10 são endêmicas) e evolutivo (evidência de evolução reticulada no gênero). Ampliar a amostragem do gênero, incluindo as espécies endêmicas do Brasil, aliada à abordagem que permite revelar a verdadeira árvore das espécies, significa avançar não somente na filogenia do grupo, mas também no conhecimento da história biogeográfica de *Polystachya* no Brasil.

2.5. CONCLUSÃO

Foram utilizados neste trabalho sequências quase completas do cloroplasto de 48 espécies de *Polystachya* usando a tecnologia de sequenciamento Illumina e a estratégia de amostragem por captura de sequências. O conjunto de dados acessados aumentou significativamente a resolução do clado proposto no estudo.

De acordo com a análise apresentada, *P. estrellensis* pode ser considerada uma espécie distinta de *P. concreta* e *P. foliosa* e, embora nossos resultados possam apontar para uma possível separação das *P. concreta* brasileiras e africanas, a delimitação de *P. concreta* permanece incerta. No caso de *P. concreta*, a evidência da hibridação influenciando na evolução deste grupo (Russell *et al.* 2010 a,b), destaca a importância da herança biparental do DNA nuclear na inferência das relações filogenéticas entre esta espécie e as outras espécies do gênero. A sinonimização de *P. estrellensis* e *P. foliosa* proposta por Mytnik-Ejsmont (2011) também não foi comprovada por este estudo. Na árvore apresentada, *P. foliosa* forma um grupo altamente suportado com *P. concreta* (amostras coletadas no Brasil).

Para viabilizar o uso da abordagem da coalescência multi-espécies, estimativas robustas das árvores de espécies são necessárias, e estas por sua vez, exigem a análise de centenas de genes não ligados (Liu *et al.* 2009) e o uso de programas específicos para este tipo de análise. Esta nova abordagem já foi apontada como o novo paradigma nos estudos de sistemática, mas trabalhos nesta área ainda são raros. Desta forma, os resultados apresentados poderão ser utilizados para direcionar estudos futuros, como a sua utilização no rastreamento de marcadores variáveis para o gênero e/ou família, ampliação da amostragem do gênero, incluindo as espécies endêmicas do Brasil, além da abordagem da árvore de espécies em detrimento à árvore de genes. Com estas novas análises, avançaremos no conhecimento da filogenia do grupo e da história biogeográfica de *Polystachya* no Brasil.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M. C. & Premoli, A. C. 2010. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Mol Phylogenet Evol*, 54: 235-242.
- Amorim, D. S. 1997. Elementos básicos da sistemática filogenética. 2. ed, Ribeirão Preto. Holos.
- Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V. T.; Barberena, F. F. V. A. & Fraga, C. N. 2010. Orchidaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB012071>).
- Bock, R. 2010. The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants. *Trends in Plant Science*, 15 (1): 11-22.
- Bräutigam, A. & Gowik, U. 2010. What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biology*, 12:831–841.
- Brenan, J. P. M. (ed.). 1954. Plants collected by the Vernay Nyasaland expedition of 1946. *Mem. New York Bot. Gard.* 9: 1–132.
- Brower, A. V. Z.; DeSalle, R. & Vogler, A. 1996. Gene trees, species trees, and systematics: A Cladistic Perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27:423–50.
- Cameron, K. M. 2005. Leave it to the leaves: A molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae). *Amer. J. Bot.*, 92: 1025–1032.
- Capella-Gutiérrez, S.; Silla-Martínez, J. & Gabaldón, T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25: 1972-1973.
- Carstens, B. C.; Pelletier, T. A.; Reid, N. M. & Satler, J. D. 2013. How to fail at species delimitation. *Mol. Ecol.*: n/a-n/a.
- Cribb, P. J. 1978. Studies in the genus *Polystachya* (Orchidaceae) in Africa. *Kew Bull.* 32: 743–766.

- Cronn , R.; Knaus , B. J.; Liston , A. P.; Maughan, J.; Parks, M.; Syring, J. V. & Udall, J. 2012. Targeted enrichment strategies for next-generation plant biology. *American Journal of Botany* 99 : 291-311.
- Daniell, D.; Lee, S-B; Saski, J. G. C; Guda, T. Q-V. C.; Tomkins, J. & Jansen, R. K. 2006. Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor Appl Genet*, 112: 1503–1518
- Darriba, D.; Taboada, G. L; Doallo R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- Degnan. J. H & Rosenberg, N. A. 2009. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(6): 332-340.
- Doyle, J. 1992. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst. Bot.*, 17(1):144-163.
- Dressler, R. L. 1990. *The Orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge University Press, Cambridge
- Eaton, D. A. R. & Ree, R. H. 2013. Inferring phylogeny and introgression using RADseq data: an example from 347 flowering plants (*Pedicularis*: Orobanchaceae). *Systematic Biology*, 0, 1–18.
- Edwards, S.V. 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution*, 63(1):1-19
- Eklblom, R. & Galindo, J. 2011. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, 107: 1-15.
- Fan, Y.; Wu, R.; Chen, M-H; Kuo, L. & Lewis, P. O. 2011. Choosing among Partition Models in Bayesian Phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.*, 28 (1): 523-532.

- Fischer, G. A.; Gravendeel, B.; Sieder, A.; Andriantiana, J.; Heiselmayer, P.; Cribb, P. J.; Smidt, E. D. C.; Samuel, R. & Kiehn, M. 2007. Evolution of resupination in malagasy species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *Molec. Phylog. Evol.*, 45:358-376.
- Gustafsson, A. L.; Verola, C. F. & Antonelli, A. 2010. Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossil and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmanseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). *Evolutionary Biology*, 10:177.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 530 p.
- Heled, J. & Drummond, A.J. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Mol. Biol. Evol.*, 27(3):570-580.
- Heled, J.; Bryant, D. & Drummond, A. J. 2013. Simulating gene trees under the multispecies coalescent and time-dependent migration. *Evolutionary Biology*, 13:44.
- Hsiao, Y.Y.; Tsai, W.C.; Kuoh, C.S.; Huang, T.H.; Wang, H.C.; Wu, T.S.; Leu, Y.L.; Chen, W.H. & Chen, H.H. 2006. Comparison of transcripts in *Phalaenopsis bellina* and *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) flowers to deduce the monoterpene biosynthesis pathway. *BMC Plant Biol.*, 6:14.
- Hsu, C.C.; Chung, Y.L.; Chen, T.C.; Lee, Y.L.; Kuo, Y.T.; Tsai, W.C.; Hsiao, Y.Y.; Chen, Y.W.; Wu, W.L. & Chen, H.H. 2011. An overview of the *Phalaenopsis* orchid genome through BAC end sequence analysis. *BMC Plant Biol.*, 11:3.
- Huang, H.; Shi, C.; Liu, Y.; Mao, S-Y. & Gao, L-Z. 2014. Thirteen *Camellia* chloroplast genome sequences determined by high-throughput sequencing: genome structure and phylogenetic relationships. *Evolutionary Biology*, 14:151.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-5.
- Jansen, R. K.; Cai, Z.; Raubeson, L. A.; Daniell, H.; Depamphilis, C. W.; Leebens-Mack, J.; Müller, K. F.; Guisinger-Bellian, M.; Haberle, R. C.; Hansen, A. K.;

- Chumley, T. W.; Lee, S. B.; Peery, R.; McNeal, J. R.; Kuehl, J. V. & Boore, J. L. 2007. Analysis of 81 genes from 64 plastid genomes resolves relationships in angiosperms and identifies genome-scale evolutionary patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 19369-19374.
- Katoh, Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780.
- Kraenzlin, F. 1926. Monographie der Gattung *Polystachya* Hook. *Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih.* 39: 1–136.
- Kubatko, L. S. 2009. Identifying Hybridization Events in the Presence of Coalescence via Model Selection. *Syst. Biol.*, 58 (5): 478-488.
- Kubatko, L.; Carstens, B. & Knowles, L. 2009. STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics*, 25 (7): 971-973.
- Larget, B.; Kotha, S.; Dewey, C. & Ané, C. 2010. BUCKy: Gene tree/species tree reconciliation with Bayesian concordance analysis. *Bioinformatics*, 26 (22): 2910-2911.
- Lemmon, A.; Emme, S.; Lemmon, E. 2012. Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics. *Systematic Biology.*, 61:727-744.
- Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25 (16): 2078-2079.
- Lima, V. L., Barros-Barreto, M. B. B. & Sylvestre, L. 2013. Filogenia morfológica e molecular das espécies de *Antigramma* sw. (Aspleniaceae). *Anais do 64º Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte-MG.*
- Liu, L. 2008. BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. *Bioinformatics*, 24 (21): 2542-2543.

- Liu, L.; Pearl, D.; Brumfield, R. & Edwards, S. 2008. Estimating Species Trees Using Multiple-Allele DNA Sequence Data. *Evolution*, 62 (8): 2080-2091.
- Liu, L.; Yu, L.; Pearl, D.K. & Edwards, S.V. 2009. Estimating species phylogenies using coalescence times among sequences. *Syst. Biol.*, 58 (5):468-477.
- Maliga, P. 2002. Engineering the plastid genome of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 164-172.
- Mamanova, L.; Coffey, A. J.; Scott, C. E.; Kozarewa, I.; Turner, E. H.; Kumar, A.; Howard, E.; Shendure, J. & Turner, D. J. 2010. Target-enrichment strategies for nextgeneration sequencing. *nature methods*, 7 (2): 111-118.
- Mardis, E. R. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24 (3):133-141.
- McCormack, J.E.; Hird, S.M.; Zellmer, A.J.; Carstens, B.C. & Brumfield, R.T. 2013. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 526–538
- Molina, J.; Hazzouri, K. M; Nickrent, D.; Geisler, M.; Meyer, R. S.; Pentony, M. M.; Flowers, J. M.; Pelsner, P.; Barcelona, J. Inovejas, S. A.; Uy, I.; Yuan, W.; Wilkins, O.; Michel, C-I.; Lear, S. L.; Concepcion, G. P. & Purugganan, M. D. 2014. Possible loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 31: 793-803.
- Moore, M. J.; Bell, C. D.; Soltis, P. S. & Soltis, D. E. 2007. Using plastid genomic-scale data to resolve enigmatic relationships among basal angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 19363-19368.
- Moore, M. J.; Soltis, P. S.; Bell, C. D.; Burleigh, J. G. & Soltis, D. E. 2010. Phylogenetic analysis of 83 plastid genes further resolves the early diversification of eudicots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 4623-4628.

- Mort, M. E.; Soltis, D. E.; Soltis, P. S.; Francisco-Ortega, J. & Santos-Guerra, A.. 2002. Phylogenetics and Evolution of the Macaronesian Clade of Crassulaceae Inferred from Nuclear and Chloroplast Sequence Data. *Systematic Botany*, 27(2): 271-288.
- Mytnik-Ejsmont, J. 2011. A monograph of the subtribe Polystachyinae Schltr. (Orchidaceae). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdanskiego, Gdansk.
- Niklas, K. J. 1997. The evolutionary biology of plants. The University of Chicago press, Chicago, 1997. p. 447.
- Njuguna, W.; Liston, A.; Cronn, R.; Ashman, T-L. & Bassil, N. 2013. Insights into phylogeny, sex function and age of *Fragaria* based on whole chloroplast genome sequencing. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 17-29.
- Parks, M.; Cronn, R. & Liston, A. 2009. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biology*, 7:84.
- Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. (eds.) 2005. *Genera Orchidacearum*, vol. 4, Epidendroideae, part 1. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.4. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rochaix, J. D. 1997. Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes. *Trends in Plant Sciences*, 2 (11): 419-425.
- Ronquist, F. M.; Teslendo, P.; van der Mark, D.; Ayres, A.; Darling, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A. & Huelsenbeeck, J. P. 2011. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61, 539-542.
- Ronquist, F.; Teslenko, M.; Van der Mark, P.; Ayres, D. L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst. Biol.*, 61(3): 539-542

- Rupp, B.; Samuel, R.; Russell, A.; Temsch, E.M; Chase, M.W. & Leitch, I.J. 2010. Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its relationships to epidermal characters. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163: 223–233
- Russell, A; Samuel, R.; Klejna, V.; Barfuss, M.H.J; Rupp, B. & Chase, M.W. 2010 (a). Reticulate evolution in diploid and tetraploid species of *Polystachya* (Orchidaceae) as shown by plastid DNA sequences and low-copy nuclear genes. *Annals of Botany*, 106: 37–56
- Russell, A.; Samuel, M. R.; Rupp, B.; Barfuss, M. H. J; Šafran, M.; Besendorfer, V. & Chase, M. W. 2010 (b). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae; Vandeeae; Orchidaceae): evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*, 59 (2): 389-404.
- Russell, A.; Samuel, R.; Bogarín, D.; Fernando, S.; Wijesundera, S.; Klejna, V. & Chase, M. W. 2011. Genetic variation and phylogenetic relationships of a pantropical species group in *Polystachya* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165: 235–250.
- Särkinen, T. & George, M. 2013. Predicting Plastid Marker Variation: Can Complete Plastid Genomes from Closely Related Species Help? *Plos One*, 8 (11).
- Song, S.; Liu, L.; Edwards, S.V. & Wu, S. 2012. Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(37):14942-14947.
- Smith, R. L. & Sytsma, K. J. 1990. Evolution of *Populus nigra* (sect. *Aigeiros*): introgressive hybridization and the chloroplast contribution of *Populus alba* (sect. *Populus*). *Amer. J. Bot.*, 77 (9): 1176-1187.
- Stull, G. W.; Moore, M. J.; Mandala, V. S; Douglas, N. A.; Kates, H. R.; Qi, X.; Brockington, S. F.; Soltis, P. S.; Soltis, D. E & Gitzendanner, M. A. 2013. A Targeted Enrichment Strategy for Massively Parallel Sequencing of Angiosperm Plastid Genomes. *Applications in Plant Sciences*, 1 (2).
- Summerhayes, V. S. 1942. African orchids: XII. *Bot. Mus. Leafl.* 10: 257-299.
- Summerhayes, V. S. 1947. African orchids: XVII. *Kew Bull.* 2: 123-133.

- Timme, R. E.; Kuehl, J. V.; Boore, J. L. & Jansen, R. K. 2007. A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: Identification of divergent regions and categorization of shared repeats. *Am. J. Bot.*, 94: 302-312.
- Tsai, W.C.; Hsiao, Y.Y.; Lee, S.H.; Tung, C.W.; Wang, D.P.; Wang, H.C.; Chen, W.H. & Chen, H.H. 2006. Expression analysis of the ESTs derived from the flower buds of *Phalaenopsis equestris*. *Plant. Sci.*, 170:426-432.
- Tsitrone, A., Kirkpatrick, M. & Levin, D. A. 2003. A model for chloroplast capture. *Evolution* 57:1776–1782.
- Van den Berg, C., Goldman, D. H., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Cameron, K. M. & Chase, M. W. 2005. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.*, 92: 613-624.
- Xie, W.; Lewis, P.O.; Fan, Y.; Kuo, L. & Chen, M-H. 2011. Improving Marginal Likelihood Estimation for Bayesian Phylogenetic Model Selection. *Syst. Biol.*, 60 (2):150-160.
- Zhang, Y-J.; Ma, P-F.; & Li, D-Z. 2011. High-throughput sequencing of six bamboo chloroplast genomes: Phylogenetic implications for temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *PLoS ONE* 6: e20596.

CAPÍTULO 3

**EVIDÊNCIAS MOLECULARES DA COLONIZAÇÃO DA ILHA DA
TRINDADE (BRASIL) E CONTRIBUIÇÕES PARA A BIOGEOGRAFIA DE**

Polystachya Hook.

3.1. INTRODUÇÃO

A biogeografia é o campo de estudo que procura compreender os processos responsáveis pela distribuição dos organismos no espaço, e sua mudança no tempo (Lomolino *et al.* 2006). Seu caráter interdisciplinar permitiu avanços metodológicos significativos e hoje é possível contar com uma série de programas e abordagens para responder às duas questões básicas dos estudos em biogeografia: “onde os organismos estão distribuídos e porque eles possuem essa distribuição” (Morrone 2009).

As relações florísticas entre o Neotrópico e África sempre representaram uma questão biogeográfica de grande interesse. Diversos autores se dedicaram à inferência da origem geográfica dos táxons e no mapeamento das espécies disjuntas (Lavin *et al.* 2000; Xiang *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2006). Acredita-se que a maioria das espécies que apresenta dispersão transatlântica proceda da África (Renner 2004), com algumas possíveis exceções nos gêneros *Andira* (Pennington 2003), *Drepanocarpus*, *Hernania*, *Hymenaea*, *Sacoglottis*, *Thalia* (Renner 2004) e na espécie *Ceiba pentandra* (Dick *et al.* 2007).

O compartilhamento de espécies pode ser explicado pela capacidade de dispersão a longas distâncias de alguns organismos ou pela deriva continental (Delgado 1993; Lavin & Luckow 1993; Moran & Smith 2001). A hipótese da Deriva Continental postula que a similaridade florística entre a América do Sul e a África resulta da distribuição contínua das espécies antes da separação dos mesmos, que teve início no período Cretáceo a cerca de 138 milhões de anos atrás (Brown & Lomolino 1998) e se consolidou em torno de 100 Ma (Sanmartin & Ronquist 2004). Já a hipótese da dispersão a longas distâncias afirma que estas afinidades florísticas são resultado de eventos de dispersão após os continentes terem efetivamente se isolado pela deriva dos continentes (Morrone 2009).

O ambiente insular representa uma ótima oportunidade para o estudo de processos biogeográficos (Emerson 2002; Emerson 2008). Especificamente, a flora de ilhas oceânicas recentes provêm indícios da viabilidade da dispersão a longas distâncias das espécies (Moran & Smith 2001), indicando muitas vezes sua atuação como *Stepping Stone*, “trampolim para espécies” (Fenley 1984) entre continentes. Ilhas oceânicas em

geral possuem biodiversidade particular, com alto percentual de espécies endêmicas. A vulnerabilidade da biota nestes ambientes é maior em relação às dos continentes devido ao espaço geográfico restrito, especificidade nas interações, e menor variabilidade genética (Serafini *et al.* 2010), evidenciando a necessidade de programas de conservação da biodiversidade local, muito vulnerável no que diz respeito ao uso e ocupação do solo.

Neste capítulo iremos integrar a hipótese filogenética encontrada para um clado de *Polystachya* com duas metodologias de análise biogeográfica histórica: o Relógio Molecular Relaxado e a reconstrução de áreas ancestrais. O objetivo deste capítulo é confrontar os resultados obtidos por estas análises com eventos biogeográficos e traçar a história da colonização da Ilha da Trindade. A abordagem do Relógio Molecular Relaxado é amplamente usada para datar eventos filogenéticos, especificamente importantes na investigação da origem da flora atual de ilhas (Bacon *et al.* 2012; 2013). Ao passo que, a área ancestral é a estimativa da área de maior probabilidade de ocorrência do ancestral comum a um grupo de táxons, gerada a partir da distribuição de uma linhagem, e de uma hipótese filogenética (Crisci *et al.* 2003).

A flora natural da Ilha da Trindade teve origem pós-deriva continental, exclusivamente através de eventos de dispersão à longas distâncias. Cerca de 10% da sua flora é endêmica, e outras várias espécies pertencem a gêneros com ocorrência na América do Sul e na África (Alves 1998). Indivíduos de *Polystachya estrellensis* foram registrados áreas florestais nas partes mais altas da Ilha, como epífita sobre *Rapanea* (Myrsinaceae), *Cyathea* (Cyatheaceae), *Sideroxylon* (Sapotaceae) e *Pisonia* (Nyctaginaceae) (Alves 1998).

Este estudo representa uma iniciativa pioneira sobre a investigação das origens continentais da flora da Ilha da Trindade. A espécie escolhida possui características biogeográficas e genéticas que a tornam adequada para este estudo de caso: primariamente, possui ampla distribuição, com espécies proximalmente relacionadas encontradas em toda faixa tropical do globo; em estudos recentes sobre o gênero, constatou-se a variação na ploidia, com grupos de espécies tetraploides na região neotropical; e dispersão recente através dos trópicos. Os resultados deste trabalho, aliados ao conhecimento já documentado para a área e a estudos futuros, poderão subsidiar planos mais adequados de manejo e recuperação da paisagem.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Área de estudo

A Ilha da Trindade, Brasil, está localizada no extremo oriental da Cadeia Vitória-Trindade, entre as coordenadas 20° 29-32' S e 29°17-21' W e ocupa uma área emersa de cerca de 10 km² (Figura 9). Distando mais de 1.100 Km da costa brasileira e 3.570 km ao ponto mais próximo da África, esta ilha se apresenta praticamente isolada no Oceano Atlântico, com exceção do pequeno arquipélago de Martin Vaz, que dista 48 km dali.

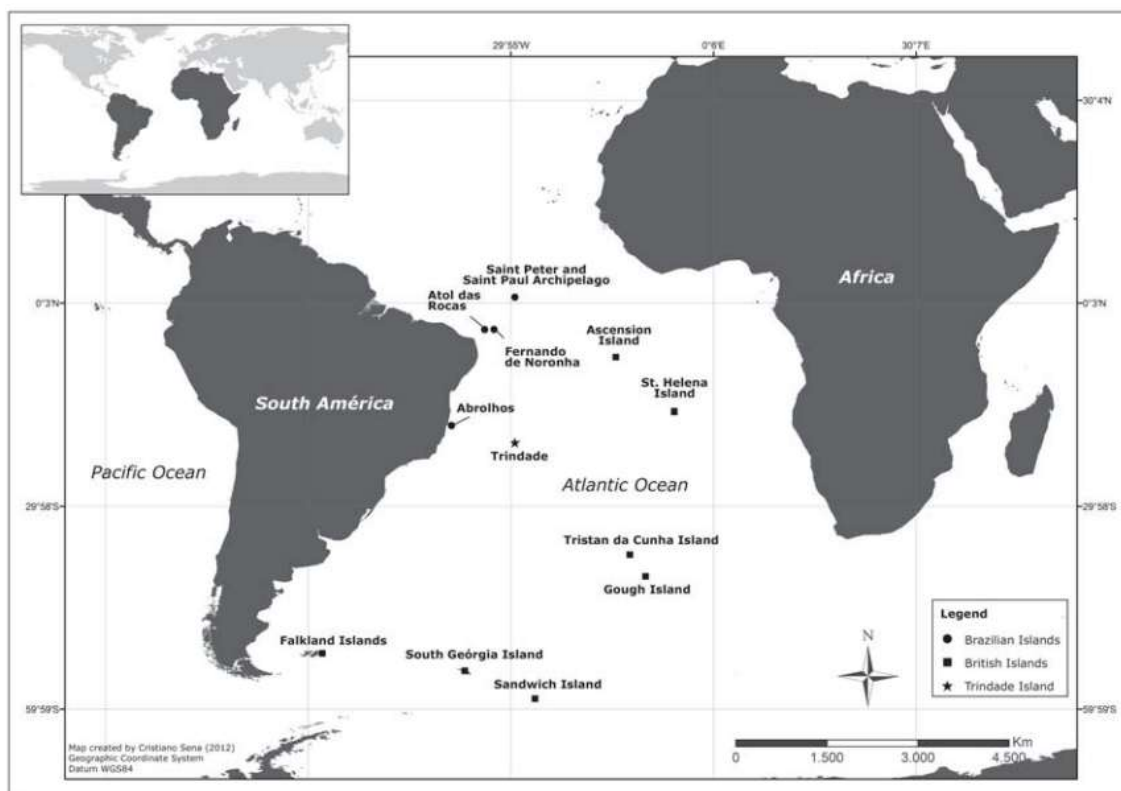


Figura 9: Mapa de localização da Ilha da Trindade. Autor: Ruy José Valka Alves.

A Ilha foi soerguida há aproximadamente 3 milhões de anos, e a última erupção vulcânica ocorreu entre o Pleistoceno e Holoceno (Almeida 2006). Seu relevo acidentado resulta de processos erosivos atuando sobre um maciço rochoso heterogêneo. Na parte central da Ilha é encontrado o pico do Desejado, o mais alto da Ilha, com 640m. O mesmo faz parte da sequência do Desejado, juntamente com os picos

de São Bonifácio e Trindade (Almeida 2000). O clima é do tipo oceânico tropical, com temperatura média anual de 25,2°C (Alves 1998).

Os açorianos iniciaram a colonização da Ilha em 1783, deflagrando seu processo de degradação, em consequência do corte predatório da vegetação e criação de ovelhas, porcos e cabras. Apesar da devastação secular causada por esses animais, a flora da Ilha inclui hoje várias espécies endêmicas de plantas vasculares. A primeira iniciativa de recuperação da vegetação ocorreu em 1994, pela Marinha do Brasil em cooperação com o Museu Nacional. As cabras foram erradicadas da Ilha em 2005, o que resultou no reaparecimento de várias espécies endêmicas a partir do banco de sementes e esporos. Assim, em fevereiro de 2010, cinco anos após a erradicação das cabras, haviam sido localizadas populações de todas as espécies vasculares endêmicas conhecidas (Silva & Alves 2011; Silva *et al.* 2013).

A Ilha da Trindade, portanto, vem passando por um processo de franca recuperação da paisagem natural, incitando a discussão sobre a origem continental do banco de sementes e esporos encontrados na Ilha e os eventos de dispersão a longas distâncias que o originou. No entanto, até o momento, iniciativas de pesquisas na Ilha da Trindade dentro da grande área das Ciências Biológicas convergem para levantamentos e aspectos da biologia da fauna vertebrada e invertebrada (ex. Vannucci 1950; Brito 1971; Mazzoleni & Schwingel 2002; Dias *et al.* 2010), levantamentos florísticos e recuperação de áreas degradadas (ex. Alves & Martins 2004; Alves 2006; Martins & Alves 2007; Faria 2012), nenhuma delas abordando as origens continentais da biota.

3.2.2. Taxons e marcadores moleculares

Para a construção da árvore datada, nós utilizamos uma matriz com dados compilados por Gustafsson *et al.* (2010), incluindo espécies selecionadas de *Polystachya* e mais cinco táxons utilizados como grupo externo na análise realizada no Capítulo 1 desta tese. Ao todo, a matriz combinada de dados possui 121 sequências de DNA plastidial (genes *matK* e *rbcL*) e 2.957 caracteres. As sequências foram alinhadas usando o MAFFT 7 (Kato & Standley 2013) e editadas no BioEdit (Hall 1999).

Na análise de reconstrução de áreas ancestrais, foi utilizado o amplo conjunto de dados plastidiais obtidos através da tecnologia NGS, apresentado no Capítulo 2. Este conjunto de dados incluiu 104 genes, seis pseudogenes, íntrons com estrutura secundária e as sequências intergênicas, sequenciados a partir de 41 amostras de *Polystachya*.

3.2.3. *Análise de datação*

O tempo de divergência entre linhagens pode ser avaliado a partir do nível de divergência molecular, ou distância genética, de sequências de DNA (ou proteínas) aliado a uma taxa de calibração da substituição dos aminoácidos, que pode ser obtida por meio da análise do registro fóssil (Bromham & Penny 2003).

Três registros fósseis disponíveis para Orchidaceae foram utilizados como pontos internos de calibração da árvore. O primeiro deles data de 15-20 Ma e é o fóssil de uma abelha que foi encontrada em âmber dominicano coberta com políneas de uma espécie de orquídea da subtribo Goodyerinae (Ramirez *et al.* 2007). Os outros dois registros são de folhas fósseis provenientes da Nova Zelândia e pertencentes ao gênero *Dendrobium* e *Earina*, datados no Mioceno Inferior (Conran *et al.* 2009).

A matriz de *Polystachya* foi analisada usando a abordagem do Relógio Molecular Relaxado com o programa BEAST v1.8.0 (Drummond *et al.* 2012). O arquivo de entrada utilizado no BEAST foi compilado no BEAUti v1.8.0 usando os seguintes parâmetros: modelo evolutivo GTR+I+G, determinado com o programa jModel Test. 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012), aplicando-se o modelo designado pelo Akaike Information Criterion (AIC) em default; *Yule process* como modelo de especiação; pontos de calibração conforme descrito acima e; quatro corridas independentes de duas cadeias MCMC para 80 milhões de gerações. As árvores e tempos de divergência estimados no BEAST foram sumarizados no programa TreeAnnotator v1.8.0, anotando a idade média de todos os nós e o seu intervalo de credibilidade de 95%. A árvore final foi visualizada no FigTree v1.4.2. 25% das árvores foram descartadas após *burn-in*. Os parâmetros amostrados na análise foram avaliados com Tracer v.1.4.1 (Rambaut & Drummond 2007) para certificar-se de que atingiram valores satisfatórios quanto aos ESSs (tamanho efetivo da amostragem).

3.2.4. *Reconstrução de área ancestral*

A reconstrução de área ancestral foi conduzida no Bayes-Lagrange, implementado no programa RASP (*Reconstruct Ancestral State in Phylogenies*) (Yu *et al.* 2011). Esta análise permite o cruzamento dos dados de distribuição atual das espécies com a topologia da árvore para inferir as probabilidades de distribuição geográfica dos nós de uma árvore filogenética. Foram amostradas 50.000 árvores binárias geradas pela análise no programa BEAST. A distribuição geográfica atual das espécies foi codificada em seis áreas: Ilhas localizadas no Oceano Índico, África, Ilha da Trindade, Brasil, Ásia e América extra Brasil. A amplitude geográfica ocupada pelas espécies foram retiradas de Barros *et al.* (2010) e Mytnik-Ejsmont (2011). A distribuição geográfica de *P. concreta* foi dividida em dois grupos, com a área de ocorrência das amostras de *P. concreta* brasileiras, limitada ao Brasil e a área de ocorrência das *P. concreta* africanas, limitadas às Ilhas do Oceano Índico, África e Ásia. Esta diferenciação levou em consideração a separação geográfica desta espécie refletida no seu posicionamento na árvore filogenética mostrada no Capítulo 2.

3.3. RESULTADOS

A estimativa molecular da idade dos clados está representada na figura 10. A análise preliminar do tempo relativo de divergência sugere que as primeiras linhagens contemporâneas divergentes de *Polysatachya* surgiram durante o Mioceno (ca 15 Ma). A separação entre as linhagens brasileiras e africanas foi acompanhada dos eventos de dispersão à longas distâncias que resultou na colonização do Brasil por este gênero. O clado que inclui as espécies brasileiras foi estabelecido antes de 1,5 Ma. Eventos de dispersão à longas distâncias também foram os responsáveis pela chegada relativamente recente de *Polystachya* na Ilha da Trindade.

A árvore de consenso obtida pela análise no BEAST e usada na análise de áreas ancestrais pode ser vista na figura 11. A figura 12 representa a reconstrução das áreas ancestrais baseada no Bayes-Lagrange para um clado de *Polystachya*. A análise sugere que o ancestral comum mais recente (ACMR) do clado correspondente às espécies brasileiras originou-se na África. Esta análise também mostrou que a linhagem de *Polystachya estrellensis* que colonizou a Ilha da Trindade teve origem das populações brasileiras desta espécie.

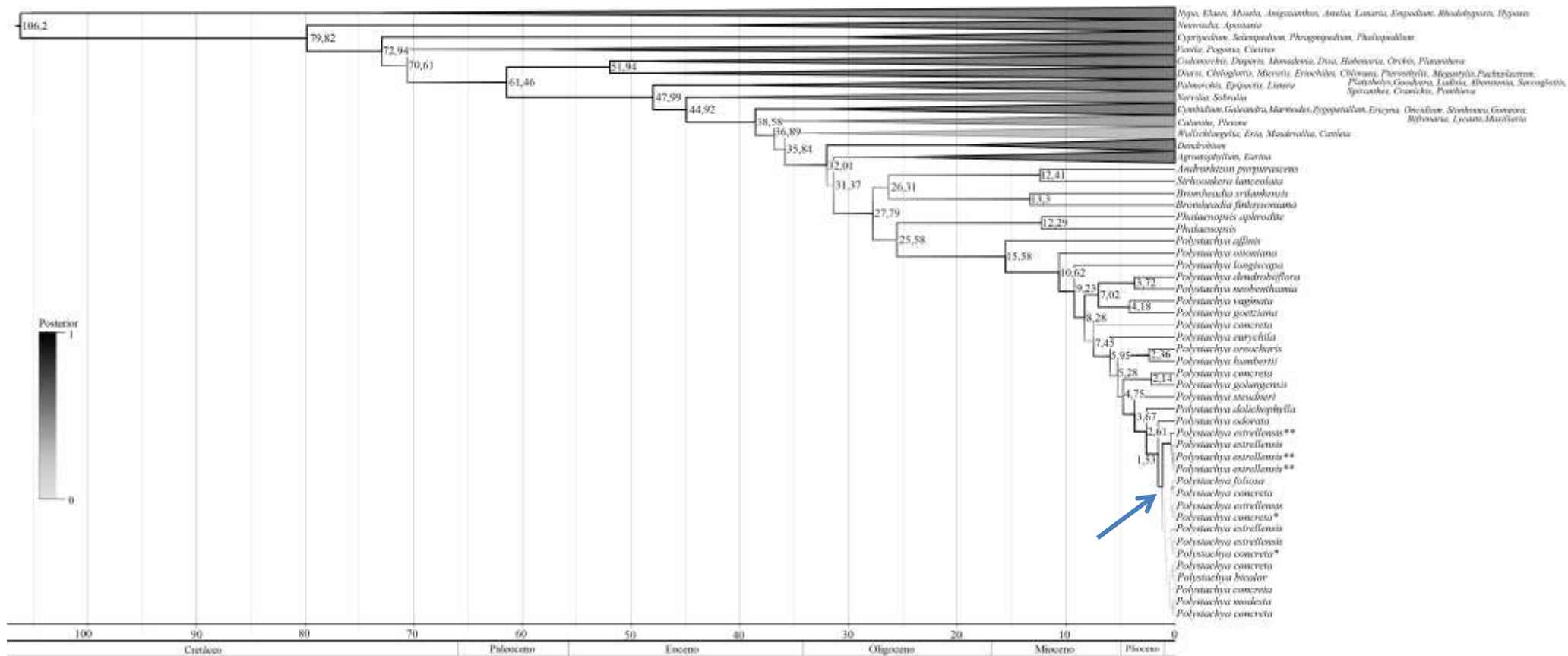


Figura 10: Árvore datada de Orchidaceae baseado em seqüências de DNA plastidial (*matK* e *rbcL*), usando três pontos internos de calibração. A raiz da árvore foi calibrada usando o registro fóssil mais antigo de Asparagales. Os nós representam a idade média em milhões de anos. **Polystachya concreta* coletada no Brasil. ***Polystachya estrellensis* coletada na Ilha da Trindade. A seta azul índia o clado que inclui as espécies coletadas no Brasil.

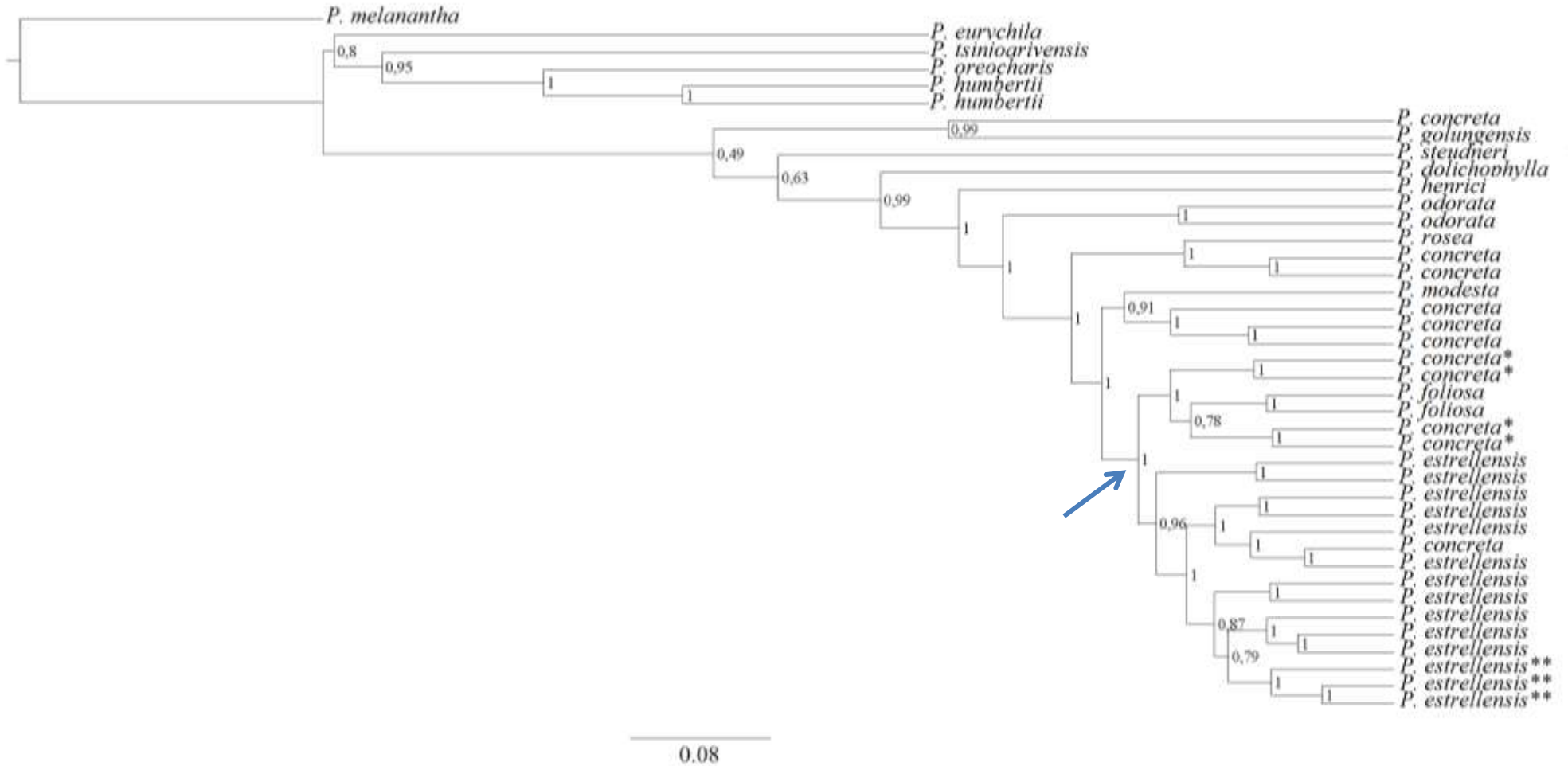


Figura 11: Árvore de consenso usada na análise de reconstrução de áreas ancestrais, baseadas na inferência bayesiana, utilizando o BEAST e o genoma quase completo do cloroplasto. O comprimento dos ramos é proporcional ao número esperado de substituições por sítio. **Polystachya concreta* coletada no Brasil. ***Polystachya estrellensis* coletada na Ilha da Trindade. A seta azul indica o clado que inclui as espécies coletadas no Brasil.

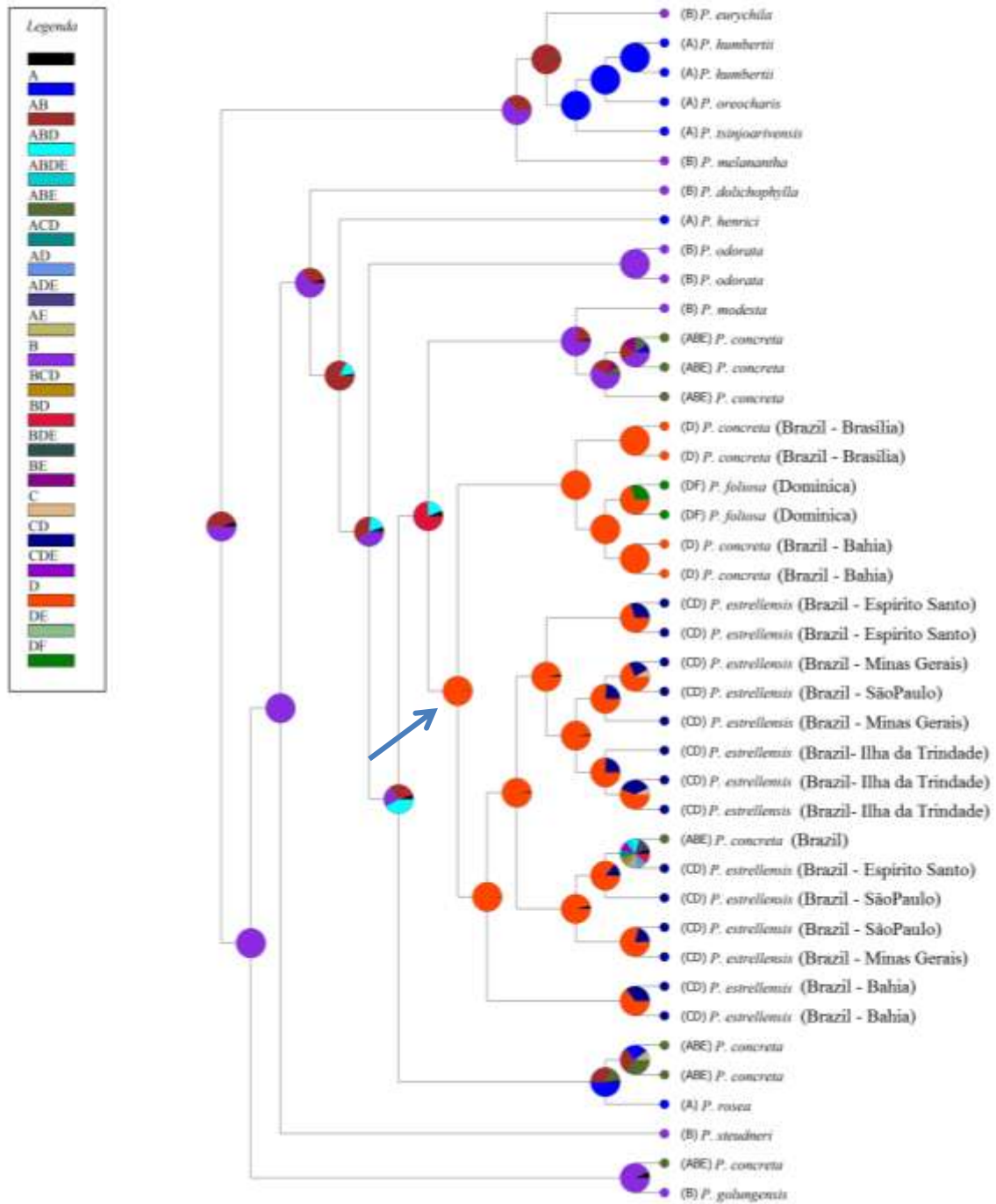


Figura 12: Reconstrução de áreas ancestrais usando o Bayes-Lagrange, implementado no programa RASP (*Reconstruct Ancestral State in Phylogenies*). A: Ilhas localizadas no Oceano Índico. B: África. C: Ilha da Trindade. D: Brasil. E: Ásia. F: América extra Brasil. A seta azul indica o local de origem provável o clado que inclui as espécies coletadas no Brasil.

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. *Datação e reconstrução de áreas ancestrais*

A África é considerada o centro de diversidade genética de *Polystachya* (Russell 2010) e também de diversidade de espécies (Dressler 1993). Ainda, acredita-se que a África oriental seja o centro de origem dos táxons, com a maioria das linhagens mais antigas endêmicas do leste africano (Russell *et al.* 2010).

A dispersão do gênero a partir da África para a Ásia e Neotrópico é recente (Russell *et al.* 2010) e com relação à chegada de táxons especificamente na América do Sul são reconhecidas três rotas possíveis. A primeira e a segunda rota são possivelmente explicadas por pontes de terra que uniam a América do Norte oriental à Europa (*North Atlantic Land Bridge*) e a América do Norte ocidental à Ásia (*Bering Land Bridge*), ambas no período Terciário.

A Ponte de Terra do Atlântico Norte (*North Atlantic Land Bridge* - NALB) é tradicionalmente considerada corredor para a migração das plantas principalmente na primeira metade do Cenozóico (Milne & Abbott 2002). Essa rota de dispersão foi comprovada para *Guatteria* (Annonaceae) cujos resultados das análises biogeográficas apontaram para a dispersão através da Ponte do Atlântico Norte no Baixo e Médio Eoceno (Erkens *et al.* 2009). A migração por essa via pode ter se estendido para além do Eoceno, constituindo-se como uma rota de migração de plantas também no final do Cenozóico (veja a revisão feita por Tiffney 2008). Por exemplo, Denk *et al.* (2010) relataram a presença de pólen de carvalho nos sedimentos datados do Mioceno na Islândia, mostrando afinidades com carvalhos brancos existentes do hemisfério norte e carvalhos vermelhos norte-americanos. Nos sedimentos datados de 15-10 Ma não há indícios de pólen de carvalhos sugerindo sua chegada após esse tempo.

A Ponte Terrestre de Bering (*Bering Land Bridge* - BLB) conectava a América do Norte ocidental à Eurásia (Hopkins 1967 *apud* DeChaine 2008). Vários indícios apontam a região da Beríngia como refúgio de plantas herbáceas, arbustivas e árvores (ex. Brubaker *et al.* 2005; DeChaine 2008). A baixa precipitação nesta região inibiu a formação de geleiras ao longo do Quaternário (Hopkins 1967 *apud* DeChaine 2008). Análises sobre tempo de divergência entre espécies relictuais forneceram indícios da

ruptura na continuidade da flora do Terciário entre a Ásia e América do Norte antes da Ponte Terrestre de Bering ser cortada, há aproximadamente 5 Ma (Milne & Abbott 2002).

A terceira rota de migração que pode ser considerada é dispersão da África diretamente para a América do Sul (Morley 2003). A dispersão a longas distâncias entre populações não é tão infrequente como antes se pensava (Schaal *et al.* 1998) e alta frequência desses eventos deve ser considerada nas hipóteses biogeográficas em detrimento ao uso da vicariância como explicação *a priori* (Queiroz 2005).

Baseado em dois marcadores de cloroplasto, Russell *et al.* (2010) indicaram duas possíveis rotas, não excludentes, da dispersão de *Polystachya* para fora da África: *i*) dispersão transatlântica da África para a América do Sul, e; *ii*) dispersão da África em direção ao sul e sudeste da Ásia e então para o Neotrópico. Estas hipóteses devem ser olhadas com cautela considerando a baixa resolução encontrada na árvore filogenética apresentada. Além disso, ambas hipóteses não encontraram suporte na reconstrução de áreas ancestrais complementar a este mesmo trabalho, devido à falta de suporte estatístico.

De acordo com os resultados preliminares deste estudo, os eventos de dispersão em direção ao Brasil ocorreram há cerca de 1,5 milhão de anos (Figura 10), após o soergimento da Ilha da Trindade (cerca de três milhões de anos) e que o ACMR do clado correspondente às espécies brasileiras originou-se no Brasil (Figura 12), descartando a hipótese de colonização direta África-Brasil, através de eventos de dispersão a longas distâncias. Tal hipótese poderia ser considerada viável devido ao tamanho diminuto das sementes de Orchidaceae e poliploidia das espécies extra-africanas (*vide* capítulo 1; Russell *et al.* 2010; Rupp *et al.* 2010), já que a correlação entre poliploidia e maior dispersão tem sido observado em alguns grupos de plantas (Brochmann *et al.* 2004; Hijmans *et al.* 2007; Lowry & Lester 2006). Em contrapartida, as correntes oceânicas são consideradas a via preponderante utilizada pelas plantas que se dispersam da África em direção à América do Sul (Renner 2004), diferente das sementes de *Polystachya*, que como as outras espécies de Orchidaceae, são dispersas pelo vento.

No Terciário, durante o ótimo climático do Baixo Eoceno (50-52 Ma) e durante o ótimo climático do final do Médio Mioceno (18-13 Ma) (Zachos *et al.*, 2001) as

condições climáticas propiciaram a expansão de florestas tropicais e movimentação da biota (Morley 2000; 2007). Lavin *et al.* (2000) demonstraram a influência do NALB sobre a disjunção de leguminosas entre a África e América. A mesma disjunção intercontinental é encontrada em *Cornus* (Cornaceae) (Xiang *et al.* 2005). Nos dois casos, o NALB é a hipótese possível para explicar a ligação terrestre de táxons tropicais entre a África e a América. Já os ancestrais de *Calycanthus* (Calycanthaceae) cruzaram o BLB, no Mioceno (Zhou *et al.* 2006). Diante do exposto, essas duas rotas de dispersão devem ser consideradas na história biogeográfica de *Polystachya*.

A capacidade de dispersão a longas distâncias por duas rotas principais, dispersão transatlântica vinda da África e dispersão de táxons norte americanos através do Istmo do Panamá, pode ter tido um papel importante na riqueza de espécies encontradas hoje no Neotrópico (Antonelli & Sanmartín 2011).

A chegada do gênero na Ilha da Trindade é um dos eventos mais recentes dentro do clado estudado (Figura 9). A reconstrução das áreas ancestrais sugere que o ACMR da linhagem de *Polystachya estrellensis* que colonizou a Ilha da Trindade teve origem das populações brasileiras desta espécie. Este resultado é confluyente com os estudos sobre a direção de migração África-América/América-África. A mesma pode estar relacionada às correntes de vento (Moran & Smith 2001; Renner 2004) e correntes oceânicas (Renner 2004). De maneira geral, a dispersão da América do Sul em direção à África envolve a dispersão através dos ventos que sopram do nordeste do Brasil para noroeste da África. O transporte pelo vento é uma explicação possível para a dispersão em direção à África de *Pitcairnia feliciana* (Bromeliaceae), *Maschalocephalus dinklagi* (Rapataceae) (Givnish *et al.* 2004), algumas linhagens lenhosas de Melastomataceae (Renner & Meyer 2001) e possivelmente *Ceiba pentandra* (Malvaceae) (Dick *et al.* 2007). Portanto, não há indícios de origem africana da espécie de *Polystachya* encontrada na Ilha da Trindade e nem da utilização da Ilha como *stepping stone* durante a chegada do gênero no Brasil.

3.4.2. *Perspectivas futuras*

A análise de reconstrução de áreas ancestrais apresentada foi baseada em um número limitado de táxons. Ao todo utilizamos 41 táxons e 15 espécies pertencentes ao

clado de *Polystachya* que inclui as espécies de interesse para este estudo. As amostras foram coletadas principalmente na África e na América do Sul, com ênfase no Brasil. Para resultados mais conclusivos acerca da chegada de *Polystachya* no Neotrópico e especialmente na América do Sul outros táxons neotropicais devem ser incluídos na análise filogenética e biogeográfica do gênero.

A análise preliminar do tempo de divergência sugere que as primeiras linhagens contemporâneas divergentes de *Polysatchya* surgiram durante o Mioceno (Figura 10). Um número expressivo de estudos revela que as espécies neotropicais têm aparecido de forma contínua desde o final do Eoceno/Baixo Oligoceno (Rull 2008). Os resultados ora apresentados representam a investigação inicial da biogeografia do gênero. Acreditamos que a obtenção de uma filogenia mais ampla de Orchidaceae e posterior datação, será essencial para resultados mais precisos do tempo de divergência de *Polystachya*. Esta análise está em processamento na Universidade de Gotemburgo utilizando o programa SUPERSMART (The Self-Updating Platform for Estimating Rates of Speciation and Migration, Ages and Relationships of Taxa) (Antonelli *et al.* 2014).

3.5. CONCLUSÃO

Nossas análises representam os resultados preliminares da história biogeográfica de *Polystachya*. Mesmo assim, revelou aspectos interessantes da colonização da Ilha da Trindade e do Brasil por espécies do gênero. A reconstrução de áreas ancestrais mostra que o ancestral comum mais recente do clado que inclui as espécies brasileiras amostradas, originou-se do Brasil. Com isso, a hipótese de dispersão direta África-Brasil pode ser descartada. Baseado na idade relativa dos nós e na filogenia apresentada no segundo capítulo, duas hipóteses possíveis podem ser consideradas acerca da dispersão do gênero para o Neotrópico: através de pontes terrestres pretéritas que ligavam a América do Norte à Ásia e América do Norte à Europa. Para resultados mais conclusivos novos terminais devem ser incluídos na análise, principalmente aqueles originados de outras áreas do Neotrópico. Com relação à colonização da Ilha da Trindade, não existem indícios de origem africana e sua colonização é resultado de eventos de dispersão a longas distâncias a partir do Brasil, provavelmente relacionados às correntes de ventos que sopram do nordeste do Brasil para noroeste da África.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, F. F. M. 2000. A Ilha da Trindade. In: Schobbenhaus, C.; Campos, D. A.; Queiroz, E. T.; Winge, M. & Berbert-Born, M. (edit.) *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil* (<http://www.unb.br/ig/sigep/sitio092/sitio092.htm>)
- Almeida, F. F. M. de 2006. Ilhas oceânicas brasileiras e suas relações com a tectônica atlântica. *Terra e Didática*, 2(1): 3–18. (<http://www.ige.unicamp.br/terraedidatica>, accessed 5 Jan. 2010).
- Alves, R. J. V. 1998. Ilha da Trindade e Arquipélago Martin Vaz: Um ensaio geobotânico. Rio de Janeiro: Serviço de Documentação da Marinha. 144 p.
- Alves, R. J. V. & Martins, L. S. G. 2004. Restabelecimento de espécies endêmicas da Ilha da Trindade. *Albertoa, Série Proteção Ambiental*, 3: 45-52.
- Antonelli, A. & Sanmartín, I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60 (2): 403-414.
- Antonelli, A.; Condamine, F. L.; Hettling, H.; Nilsson, K.; Nilsson, R. H.; Oxelman, B. Sanderson, M. J.; Sauquet, H.; Scharn, R.; Silvestro, D.; Töpel, M. & Vos, R. A. 2014. SUPERSMART: Ecology and Evolution in the Era of Big Data. *PeerJ PrePrints* | <http://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.501v1> | CC-BY 4.0 Open Access.
- Bacon, C. D.; Baker, W. J. & Simmons, M. P. 2012. Miocene Dispersal Drives Island Radiations in the Palm Tribe Trachycarpeae (Arecaceae). *Syst. Biol.*, 61(3):426-442.
- Bacon, C. D.; Mora, A., Wagner, W. L. & Jaramillo, C. A. 2013. Testing geological models of evolution of the Isthmus of Panama in a phylogenetic framework. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171: 287-300.
- Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V. T.; Barberena, F. F. V. A. & Fraga, C. N. 2010. Orchidaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB012071>).
- Brito, I. M. 1971. Contribuição ao conhecimento dos Echinodermas da Ilha da Trindade, Brasil. *Arq. Mus. Nac.* 54: 261-265.

- Brochmann, C.; Brysting, A. K.; Alsos, I. G.; Borgen L.; Grundt, H. H.; Scheen, A. C. & Elven, R. 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 521-536.
- Bromham, L. & Penny, D. 2003. The Modern Molecular Clock. *Nature Reviews*, 4.
- Brown, J. H. & Lomolino, M. V. 1998. *Biogeography*. Ed. Sinauer, Sunderland.
- Brubaker, L. B; Anderson, P. M, Edwards, M. E. & Lozhkin, A. V. 2005. Beringia as a glacial refugium for borealtrees and shrubs: new perspectives from mapped pollen data. *Journal of Biogeography*, 32: 833-848.
- Conran, J.G.; Bannister, J. M. & Lee, D. E. 2009. Earliest orchid macrofossils: Early Miocene *Dendrobium* and *Earina* (Orchidaceae: Epidendroideae) from New Zealand. *American Journal of Botany*, 96(2):466-474.
- Crisci, J. V.; Katinas, L. & Posadas, P. 2003. *Historical biogeography: An introduction*. London: Harvard University Press.
- Darriba, D.; Taboada, G. L; Doallo R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- DeChaine, E. G. 2008. A bridge or a barrier? Beringia's influence on the distribution and diversity of tundra plants. *Plant Ecology & Diversity*, 1 (2): 197-207
- Delgadillo, M. C. 1993. The neotropical-African moss disjunction. *Briologist*, 96:604-615.
- Denk, T.; Grímsson, F. & Zetter, R. 2010. Episodic migration of oaks to Iceland: evidence for a North Atlantic "Land Bridge" in the latest Miocene. *American Journal of Botany*, 97(2): 276-287.
- Dias R. A.; Agne, C. E.; Gianuca, D.; Gianuca, A.; Barcellos-Silveira, A.; Bugoni, L. 2010. New records, distribution and status of six seabird species in Brazil. *Iheringia, Série Zoologia* 100: 379-390.
- Dick, C.W.; Bermingham, E.; Lemes, M.R. & Gribel, R. 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, 16: 3039–3049.

- Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the Orchid family. Portland: Dioscorides Press.
- Drummond, A. J; Suchard, M. A; Xie, D. & Rambaut, A. 2012 Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7.5. Mol. Biol. Evol. 29, 1969 – 1973. (doi:10.1093/molbev/mss075).
- Emerson, B. C. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding patterns and process. Molecular Ecology, 11: 951-966.
- Emerson, B. C. 2008. Speciation on islands: what are we learning? Biological Journal of the Linnean Society, 95 (1): 47-52.
- Erkens, R. H. J.; Maas, J. W. & Couvreur, T. L. P. 2009. From Africa via Europe to South America: migrational route of a species-rich genus of Neotropical lowland rain forest trees (*Guatteria*, Annonaceae). Journal of Biogeography, 36: 2338-2352.
- Faria, A. L. A. 2012. Briófitas da Ilha da Trindade: um estudo taxonômico e bioecográfico. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília.
- Flenley, J. R. 1984. Time Scales in Biogeography. In: (Ed.) Taylor, J. A. Biogeography: Recent Advances and Future Directions.
- 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–African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on ndhF sequence data. Int J Plant Sci, 165(suppl):S000–S000.
- Gustafsson, A. L. S.; Verola, C. F. & Antonelli, A. 2010. Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). BMC Evolutionary Biology, 10:177
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

- Hijmans, R. J.; Gavrilenko T.; Stephenson, S.; Bamberg, J.; Salas, A. & Spooner, D. M. 2007. Geographical and environmental range expansion through polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). *Global Ecology and Biogeography* 16: 485-495.
- Hopkins, D. M. 1967. *The Bering Land Bridge*. Stanford: Stanford University Press.
- Katoh, Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780.
- Lavin, M. & Luckow, M. 1993. Origins and relationships of tropical North America in the context of boreotropics hypothesis. *Amer. J. Bot.*, 80:1-14.
- Lavin, M.; Thulin, M.; Labat, J. N. & Pennington, R. T. 2000. Africa, the odd man out: molecular biology of dalbergioid legumes (Fabaceae) suggests otherwise. *Systematic Botany*, 25: 449-467.
- Lomolino, M. V.; Riddle, B. R. & BROWN, J. 2006. *Biogeography*. 3rd ed., Sunderland: Sinauer, 691 p.
- Lowry, E. & Lester, S. E. 2006. The biogeography of plant reproduction: potential determinants of species' range sizes. *Journal of Biogeography*, 33: 1975-1982.
- Martins, L. S. G. & Alves, R. J. V. 2007. Regeneração natural do Morro Vermelho, Ilha da Trindade. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 39-41.
- Mazzoleni, R. C. & Schwingel, P. R. 2002. Aspectos da biologia das espécies capturadas por espinhel pelágico na região sul das ilhas de Trindade e Martin Vaz no verão de 2001. *Notas Téc. Facimar*, 6: 51-57.
- Milne, R. I. & Abbott, R. J. 2002. The Origin and Evolution of Tertiary Relict Floras. *Advances in Botanical Research*, 38: 281–314.
- Moran, R. C & Smith, A. R. 2001. Phytogeographic relationships between neotropical and African-Madagascan pteridophytes. *Brittonia*, 53: 304-351.
- Morley, R. J. 2000. *Origin and evolution of tropical rain forests*. John Wiley, New York.

- Morley, R. J. 2003. Interplate dispersal paths for megathermal angiosperms. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 6: 5-20.
- Morley, R. J. 2007. Cretaceous and Tertiary climate change and the past distribution of megathermal rainforests. *Tropical rainforest responses to climate changes* (ed. by M.B. Bush and J. Flenley), Praxis, Chichester, UK.
- Morrone, J. J. 2009. *Evolutionary Biogeography: An Integrative Approach with Case Studies*. Columbia University Press, New York.
- Mytnik-Ejsmont, J. 2011. A monograph of the subtribe *Polystachyinae* Schltr. (Orchidaceae). Wydawnictwo Uniwersytetu Gdanskiego, Gdansk.
- Pennington, R. T. 2003. Monography of *Andira* (Leguminosae-Papilionoideae). *Systematic Botany Monographs*, 64.
- Queiroz, A. 2005. The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 20 (2): 68-73.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.4. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramirez, S. R.; Gravendeel, B.; Singer, R. B.; Marshall, C. R. & Pierce, N. E. 2007. Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, 448:1042-1045.
- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*, 17: 2722-2729.
- Renner, S. 2004. Plant dispersal across the Tropical Atlantic by wind and sea currents. *Int. J. Plant Sci.* 165(4Suppl.):S23-S33.
- Renner, S.S. & Meyer, K. 2001. Melastomeae come full circle: biogeographic reconstruction and molecular-clock dating. *Evolution*, 55: 1315–1324.
- Rupp, B; Samuel, R; Russell, A; Tensch, E. M.; Chase, M. W. & Leitch, I. J. 2010. Genome size in *Polystachya* (Orchidaceae) and its relationships to epidermal characters. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163: 223-233.

- Russell, A.; Samuel, M. R.; Rupp, B.; Barfuss, M. H. J.; Šafran, M.; Besendorfer, V. & Chase, M. W. 2010 (b). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae; Vandeeae; Orchidaceae): evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*, 59 (2): 389-404.
- Sanmartin, I. & Ronquist, F. 2004. Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Syst. Biol.*, 53: 216-243.
- Serafini, T. Z.; França, G. B. & Andriguetto-Filho, J. M. 2010. Ilhas oceânicas brasileiras: biodiversidade conhecida e sua relação com o histórico de uso e ocupação humana. *Revista da Gestão Costeira Integrada* 10(3): 281-301.
- Schaal, B. A.; Hayworth, D. A.; Olsen, K. M.; Rauscher, J. T. & Smith, W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474.
- Silva, N. G. da ; ALVES, R. J. V. 2011. The eradication of feral goats and its impact on plant biodiversity a milestone in the history of Trindade Island, Brazil. *Rodriguesia*, 62: 717-719.
- Silva, N. G.; Alves, R. J. V.; Sylvestre, L. S.; Santos, R. B. 2013. Two rediscoveries and one extinction for the flora of Trindade Island, Brazil. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 140: 230-235.
- Tiffney, B. H. 2008. Phylogeography, fossils, and Northern Hemisphere biogeography: The role of physiological uniformitarianism. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 95: 135-143.
- Vannucci, M. 1950. Resultados Científicos do Cruzeiro fazer "Baependi" e fazer "Vega" à Ilha da Trindade: Hydrozoa. *Bol. Inst. Paulo. Oceanografia*. [online]. 1950, vol.1, n.1, pp 81-96.
- Xiang, Q-Y; Manchester, S. R; Thomas, D. T.; Zhang, W. H. & Fan, C. 2005. Phylogeny, biogeography, and molecular dating of cornelian cherries (*Cornus*, Cornaceae): tracking Tertiary plant migration. *Evolution* 58, 1685-1700.
- Yu Y.; Harris, A. J & He X-J. 2011. RASP (reconstruct ancestral state in phylogenies) 2.0 beta. Available at: <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>.

- Zachos, J.; Pagani, M.; Sloan, L.; Thomas, E. & Billups, K. 2001. Trends, rhythms, and aberration in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292: 686-693.
- Zhou, S.; Renner, S. S. & Wen, J. 2006. Molecular phylogeny and intra- and intercontinental biogeography of Calycanthaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 1-15.

ANEXO I: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO CTAB COM MODIFICAÇÕES

REAGENTES E SOLUÇÕES

- 1) 2% CTAB (Lysis Buffer)
 - 0,2 g CTAB
 - 5,78 ml de água destilada
 - 1 ml de TRIS-HCl [1M]
 - 2,8 ml de NaCl [5M]
 - 0,4 ml EDTA [0,5M]
 - 20 µl mercaptoetanol
- 2) Clorofórmio
- 3) Isopropanol
- 4) Etanol 70%
- 5) TE Buffer

PROTOCOLO

- 1) Triturar 20 mg de folha seca em sílica gel (frequência 30/s ca. 1 min).
- 2) Adicionar 750 µl de CTAN 2% e aquecer a 65°C por 40 min. Vortexar a mistura de tempos em tempos.
- 3) Marcar 3 séries de ependorfes (1,5 ml) para as próximas etapas.
- 4) Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm e transferir o sobrenadante para um novo tubo.
- 5) Adicionar 1 volume de clorofórmio/isoamylalcohol [24:1] e agitar por 30 minutos
- 6) Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
- 7) Colocar o sobrenadante em um novo tubo.
- 8) Repetir o passo 5.
- 9) Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm. Colocar o sobrenadante em um novo tubo.
- 10) Precipitar o DNA com 1,5V de isopropanol.
- 11) Misturar e deixar em *over-night*.
- 12) Centrifugar por 30 minutos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante por derramamento.
- 13) Ressuspender o DNA adicionando 200 µl de etanol 70% (-20°C).
- 14) Centrifugar por 5 minutos a 7.000 rpm, escorrer e deixar secar por 5 minutos.
- 15) Ressuspender o pelet em 50 µl de água destilada mais 50 µl de TE Buffer.
- 16) Misturar até dissolver o pelet.

PURIFICAÇÃO DO DNA

- 1) Adicionar 3 volumes de solução NaI.

- 2) Calcular o volume de Glassmilk necessária a cada amostra (1 volume de Glassmilk para cada 20 volumes de NaI+DNA) e adicionar a solução.
- 3) Vortexar o Glassmilk por 1 minuto antes de adicionar à solução do passo anterior.
- 4) Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos e misturar.
- 5) Descartar o sobrenadante.
- 6) Adicionar 500 µl de “Prepared NEW Wash”.
- 7) Centrifugar por 5 minutos e descartar o sobrenadante.
- 8) Repetir os passos 6 e 7.
- 9) Secar o pelet e remover o etanol residual.
- 10) Adicionar água. O volume de H₂O deve ser igual ao usado de Glassmilk. Ressuspenda o pelet e misture para diluir o DNA.
- 11) Centrifugar por 30 segundos e remover o sobrenadante que contem o DNA.