

Sistemática e Evolução de *Calamorhipsalis* K.Schum. (*Rhipsalis*, Cactaceae)

Responsável: Weverson Cavalcante Cardoso

Resumo: As aréolas, sinapomorfias de Cactaceae, são ramos curtos, onde aglomeram-se gemas laterais, que geralmente estão localizadas na superfície dos ramos longos, dando origem aos espinhos, tricomas e flores. Algumas espécies de *Rhipsalis* Gaertn. possuem flores com o desenvolvimento interno aos ramos longos, e de alguma forma o meristema floral presente na aréola se submerge no caule. Nos estágios finais do desenvolvimento, a flor rompe a epiderme caulinar e expõe suas peças florais para fora do caule, permanecendo apenas seu pericarpelo imerso. Uma recente proposta de classificação para *Rhipsalis* agrupa todas as espécies com pericarpelo floral imerso no subgênero *Calamorhipsalis* K.Schum., enquanto outra igualmente recente trata essas espécies em três subgêneros diferentes, mas com grande parte delas em *Calamorhipsalis*. Assim, o objetivo desse estudo é investigar e propor hipóteses sobre a evolução de *Rhipsalis* subg. *Calamorhipsalis*, utilizando dados morfológicos, anatômicos e moleculares.

Abstract: The areoles, synapomorphy of Cactaceae, are short shoots, where lateral gems are agglomerated. They are usually located in the surface of the long shoots, producing spines, trichomes and flowers. Some species of *Rhipsalis* Gaertn. have flowers with internal development in the long shoots, and in some way the floral meristem located at areoles is sunken in the stem. At the final stages of the development, the flower breaks up the epidermis and exposes the floral parts out of the stem, holding immersed only the floral pericarpel. A recent propose of classification groups all *Rhipsalis* with floral pericarpel immersed in the subgenus *Calamorhipsalis* K.Schum., while another equally recent propose ranks these species at three different subgenus, most of them at *Calamorhipsalis*. Therefore, the aim of this study is to investigate and propose hypothesis about the evolution of *Rhipsalis* subg. *Calamorhipsalis*, using morphological, anatomic and molecular data.

Introdução

Pertencente à ordem Caryophyllales (APG 2016), Cactaceae é uma família predominantemente endêmica à região Neotropical que possui cerca de 1400 espécies subordinadas a 124 gêneros e quatro subfamílias: Cactoideae, Maihuenioideae, Opuntioideae e Pereskioideae (Anderson 2001; Hunt et al. 2006). Fortemente sustentada como monofilética em análises filogenéticas, Cactaceae possui como principais sinapomorfias a inversão de seis mil pares de base em uma região de DNA plastidial (Wallace 1995) e a presença das aréolas, ramos curtos onde se acumulam gemas laterais, de onde saem espinhos,

tricomas e flores, geralmente localizadas sobre a superfície dos ramos de crescimento longo, o caule propriamente dito (Boke 1980; Buxbaum 1950). À Cactoideae estão subordinadas as cactáceas epífitas, que posicionam Cactaceae no sexto lugar no ranking das famílias de plantas epífitas vasculares mais representativas da Floresta Atlântica (Freitas et al. 2016). Neste bioma, Rhipsalideae, tribo predominantemente epífita, tem seu centro de diversidade e endemismo (Calvente et al. 2011a; Barthlott et al. 2015). A tribo possui atualmente quatro gêneros, sendo eles *Hatiora* Britton & Rose, *Lepismium* Pfeiff., *Rhipsalis* Gaertn. e *Schlumbergera* Lem. (Calvente et al. 2011b), e sua história taxonômica é bastante controversa, com diversas mudanças nas circunscrições desses gêneros até recentemente (Barthlott 1987; Barthlott & Taylor 1995; Calvente 2012; Calvente et al. 2011b; Korotkova et al. 2011). *Rhipsalis*, o maior gênero da tribo, é tradicionalmente composto por cinco subgêneros (Barthlott & Taylor 1995): *Calamorhipsalis* K. Schum., *Epallagogonium* K. Schum., *Erythrorhipsalis* A. Berger, *Phyllarthrorhipsalis* Buxb. e *Rhipsalis*. Recentemente, dois estudos de sistemática molecular testaram a delimitação desses subgêneros, utilizando diferentes marcadores moleculares, e obtiveram resultados antagônicos em alguns pontos. O subgênero *Rhipsalis* s.l. foi revisado por Calvente (2010), incluindo 21 espécies, recebendo uma chave para estas espécies. Nas novas propostas (Calvente 2012; Korotkova et al. 2011), *Erythrorhipsalis* permanece com a mesma circunscrição, e chaves para suas espécies estão disponíveis nos trabalhos de Barthlott & Taylor (1995) e Freitas et al. (2009). Contudo, as diferentes delimitações de *Calamorhipsalis* com a inclusão ou não de espécies de *Epallagogonium* e *Goniorhipsalis* demandam revisão, com a disponibilização de uma chave unificada para o subgênero. Apesar das aréolas da grande maioria dos Rhipsalideae não produzirem espinhos na maturidade do indivíduo, na fase de plântula, as aréolas recobrem a superfície caulinar com delicados espinhos, mesmo em espécies onde ocorrem aréolas submersas na maturidade (Secorun & Souza 2011). Em *Echinocereus* (tribo Pachycereeae, sensu Hunt et al. 2006), as aréolas ocorrem superficialmente, no ápice de tubérculos caulinares, produzem espinhos em sua maturidade e, após a formação destes, o meristema areolar é selado por camadas peridérmicas, ocorrendo um intenso crescimento dos tecidos caulinares acima desse meristema, posicionando-o no interior do caule (Sánchez et al. 2015). A investigação do processo de submersão das aréolas em *Rhipsalis* evidenciará possíveis padrões de desenvolvimento para o gênero, dando subsídios à delimitação de suas linhagens.

Justificativa

Nos últimos anos, o uso da taxonomia integrativa vem crescendo. Diferentes áreas de conhecimento servem como fonte de caracteres e podem contribuir no estudo da evolução de linhagens e podem corroborar (ou não) as classificações existentes (Rouhan & Gaudeul 2014). Adicionalmente ao estudo

da macromorfologia dos caracteres florais como tradicionalmente realizado, esse tipo de abordagem permite o uso de caracteres anatômicos nas análises. Esses caracteres podem ser analisados posteriormente numa perspectiva filogenética.

Cactaceae é um dos grandes grupos com maior quantidade de espécies ameaçadas mundialmente (Goettsch et al. 2015). Adicionalmente, *Rhipsalis* é um gênero que habita principalmente a Floresta Atlântica, possuindo alta taxa de raridade e endemismo no bioma. A presença dessas espécies pode subsidiar a conservação de áreas que as servem de habitat.

Objetivos:

Objetivo geral:

O objetivo geral do trabalho é investigar e propor hipóteses sobre a evolução de *Rhipsalis* subg. *Calamorhipsalis*, contribuindo para a sistemática do grupo.

Objetivos específicos:

- Propor hipóteses filogenéticas sobre a história evolutiva das linhagens de *Rhipsalis* com aréolas submersas, com base em caracteres morfológicos, anatômicos e moleculares;
- Revisar o subgênero *Calamorhipsalis* e a delimitação de suas espécies;
- Investigar a eficiência da anatomia vegetal como ferramenta na taxonomia do grupo;
- Elaborar uma chave de identificação para as espécies de *Calamorhipsalis*;
- Avaliar o estado de conservação de todos os *Calamorhipsalis* para o Brasil.

Materiais e Métodos

Para realização deste projeto estão previstas análises morfológicas, anatômicas e moleculares. O estudo investigará 15 táxons de Rhipsalideae, dez deles subordinados a *Rhipsalis* subg. *Calamorhipsalis* (Tabela 1). Serão realizadas expedições a campo em ambientes de Floresta atlântica, onde serão coletados três ramos férteis (material testemunho) de três indivíduos por localidade, para abranger a variação morfológica. Serão coletadas também cinco flores de cinco indivíduos para o estudo anatômico. O material testemunho será depositado no herbário do Museu Nacional (R).

As flores serão fixadas em solução de formaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2 (Gahan 1984), submetidas à baixa pressão, desidratadas em série etílica, emblocadas em Historesin® (Leica) e seccionadas com navalha de vidro em micrótomo rotativo, modelos Spencer 820 (American Optical Co) e RM2255 (Leica). Secções seriadas de 1-3 µm de espessura serão coradas com Azul de Toluidina O 0,05% (Feder & O'Brien 1968).

Para as estimativas acerca da história evolutiva de *Rhipsalis* subg. *Calamorhipsalis* serão realizadas análises filogenéticas moleculares e mapeamento de caracteres morfológicos seguindo as metodologias empregadas por Calvente et al. (2011a) na filogenia de *Rhipsalis*, com as alterações sempre que necessárias. Serão amplificadas três regiões de DNA plastidial e duas nucleares utilizadas previamente no estudo de Calvente et al. (2011a): trnQ-rps16, psbA-trnH, rpl32-trnL, ITS e MS. As sequências serão geradas a partir de produtos purificados de PCR usando o kit BigDye (Applied Biosystems) e os produtos das reações de sequenciamento serão purificados usando kit de purificação magnética (Agilent) e sequenciados em sequenciador automático ABI3500. Serão utilizadas informações obtidas em materiais coletados e processados anatomicamente neste estudo, de herbário, de observações de campo e da literatura. Uma matriz de caracteres morfológicos será construída, baseada em caracteres vegetativos e reprodutivos.

A revisão taxonômica de *Rhipsalis* subg. *Calamorhipsalis* será realizada com base no estudo de materiais coletados em excursões à campo ao longo da Floresta Atlântica, centro de diversidade e endemismo do gênero, além dos materiais já disponíveis em herbários, como o BHCB, CEPEC, CESJ, ESA, FLOR, FURB, HRCB, HUEFS, ICN, MBM, MBML, R, RB, SP, SPF, UEC, UPCB e VIES. Os materiais dos herbários sempre que possível serão estudados pessoalmente em visitas aos herbários e/ou através de pedidos de empréstimo, mas quando preciso, com o auxílio de ferramentas online como a rede speciesLink e o Herbário Virtual Re flora.

Tabela 1. Táxons amostrados neste estudo.

Subgênero	Espécie
<i>Calamorhipsalis</i>	<i>R. dissimilis</i> (G. Lindb.) K.Schum.
	<i>R. floccosa</i> subsp. <i>floccosa</i> Salm-Dyck ex Pfeiff.
	<i>R. floccosa</i> subsp. <i>oreophila</i> N. P. Taylor & Zappi
	<i>R. floccosa</i> subsp. <i>pulvinigera</i> (G. Lindb.) Barthlott & N.P. Taylor
	<i>R. hoelleri</i> Barthlott & N. P. Taylor
	<i>R. neves-armondii</i> K.Schum.

	<i>R. pacheco-leonis</i> Loefgr.
	<i>R. paradoxa</i> (Salm-Dyck ex Pfeiff.) Salm-Dyck
	<i>R. puniceodiscus</i> G. Lindb.
	<i>R. trigona</i> Pfeiff.
<i>Erythrorhipsalis</i>	<i>R. cereuscula</i> Haw.
	<i>R. crispata</i> Pfeiff.
<i>Rhipsalis</i>	<i>R. lindbergiana</i> K.Schum.
	<i>R. teres</i> Steud.
Grupo externo	<i>Hattoria salicornioides</i>

Custos do Projeto

Item	Valor
Passagens aéreas	R\$1.480
Aluguel de carro e gasolina	RS 3.400
Despesas gerais em campo	R\$ 2.800
Materiais de laboratório	R\$ 1.000
Equipamentos	R\$ 1.120
Reagentes	R\$1.200
Sequenciamento	R\$1.000
Total	R\$ 12.000

Cronograma de execução

Atividades	Ano/Trimestre															
	2017				2018				2019				2020			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Excursões a campo																
Consulta a herbários																
Anatomia Floral																
Estudo molecular																

[illegible]

Referências Bibliográficas

- Almeida, O.J.G.; Cota-Sánchez, J.H. & Paoli, A.A.S. 2013a. The systematic significance of floral morphology, nectaries, and nectar concentration in epiphytic cacti of tribes Hylocereeae and Rhipsalideae (Cactaceae). *15*(3): 255-268.
- Almeida, O.J.G.; Paoli, A.A.S.; Sousa, L.A. & Cota-Sánchez, J.H. 2013b. Seedling morphology and development in the epiphytic cactus *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw. (Cactaceae: Hylocereeae). *J. Torrey. Bot. Soc.* **140**:196-214.
- Amaral, L.I.V.; Pereira, M.F.D.A.; Cortelazzo, A.L. 2001. Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. - Bixaceae). *Acta Botanica Brasílica* **15**(1): 125-132.
- Anderson, E.F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press, Portland. 776p.
- APG. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**(1): 1-20.
- Barthlott, W. & Taylor, N.P. 1995. Notes towards a monograph of Rhipsalideae (Cactaceae). *Bradleya* **13**: 43-79.
- Barthlott, W. 1987. New names in Rhipsalidinae (Cactaceae). *Bradleya* **5**, 97–100.
- Boke, N.H. 1980. Developmental Morphology and Anatomy in Cactaceae. *BioScience* **30**(9): 606-610.
- Britton, N.L. & Rose, J.N. 1923. *The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family*. The Carnegie Institution of Washington **248**(4).
- Buxbaum, F. 1950. *Morphology of cacti. I. Roots and stems*. Abbey Garden Press, Pasadena. 87p.
- Calvente, A. A New Subgeneric Classification of *Rhipsalis* (Cactoideae, Cactaceae). *Systematic Botany* (2012) **37**(4): pp. 983–988.
- Calvente, A.; Zappi, D.C.; Forest, F. & Lohmann, L.G. 2011a. Molecular phylogeny, evolution, and biogeography of South American epiphytic cacti. *International Journal of Plant Sciences* **172**(7):902-914.
- Calvente, A.; Zappi, D.C.; Forest, F. & Lohmann, L.G. 2011b. Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **58**: 456–468.
- Calvente, A.M. 2010. *Filogenia molecular, evolução e sistemática de Rhipsalis* (Cactaceae). Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo. 185p.

Calvente, A.M.; Andreato, R.H.P. & Vieira, R.C. 2008. Stem anatomy of *Rhipsalis* (Cactaceae) and its relevance for taxonomy. *Plant Syst Evol* 276: 271-277.

Cardoso, W.C. 2017. Estudos em Cactaceae do Espírito Santo: taxonomia e conservação. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, Universidade Rio de Janeiro. 118p.

CRIA. 2017. speciesLink. Centro de Referência em Informação Ambiental, Campinas. Disponível em <<http://www.splink.org.br>>. Acesso em 02 de abril de 2017.

Doyle J.A.; Doyle, J.L. 1987 A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15.

Edwards, E.J.; Nyffeler, R. & Donoghue, M.J. 2005. Basal cactus phylogeny: Implications of *Pereskia* (Cactaceae) to the cactus life form. *American Journal of Botany* 92(7): 1177–1188.

Feder, N. & O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer. J. Bot.* 55(1): 1338-1340.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2015. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2013-2014. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica. 60p.

Gahan, P.B. 1984. Plant histochemistry and citochemistry: an introduction. Academic Press, p.101-145.

Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2): 221–224.

Groot, S.J. 2011. Collecting and processing cacti into herbarium specimens, using ethanol and others methods. *Systematic Botany* 36(4): 981–989.

Guaraldo, A.C.; Boeni, B.O. & Pizo, M. 2013. Specialized Seed Dispersal in Epiphytic Cacti and Convergence with Mistletoes. *Biotropica* 45(4): 465–473.

Guindon S.; Dufayard J.F.; Lefort V.; Anisimova M.; Hordijk W.; Gascuel O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59: 307-321.

Hernández-Hernández, T.; Hernández, H.M.; De-Nova, J.A.; Puente, R.; Eguiarte, L.E. & Magallón, S. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98(1): 44–61.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* (8):754-5.

Hunt, D. R.; Taylor, N. & Charles, G. (Eds.). 2006. The New Cactus Lexicon. Text. Dh Publications, Milborne Port.

Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. Bombay: Tata McGraw-Hill Book Company.

- Korotkova, N.; Borsch, T.; Quandt, D.; Taylor, N.P.; Müller, K.F. & Barthlott, W. 2011. What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). *American Journal of Botany* 98(9): 1549–1572.
- Langeron, M. 1949. *Précis de microscopie*, Paris, Masson et Cie. Editers.
- Lema-Ruminska, L. & Kulus, D. 2014. Micropropagation of cacti: a review. *Haseltonia* 19: 46–63.
- Lindberg, G.A. 1893. *Rhipsalis puniceodiscus*. In: *Gartenflora* 42: 233.
- Loefgren, A. 1915. O gênero *Rhipsalis*. *Arch. Jar. Bot. Rio de Janeiro* 1: 59-104.
- Löfgren, A. 1918. Novas Contribuições para o gênero *Rhipsalis*, *Arch. Jar. Bot. Rio de Janeiro* 2: 34-45.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34:125-128.
- McLean, R.C. & Ivimey-Cook, W.R. 1952. *Textbook of theoretical botany*. London; New York : Longmans, Green. 3912p.
- Nyffeler, R. & Eggli, U. 2010. A farewell to dated ideas and concepts: molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia* 6: 109-149.
- Nyffeler, R. 2002. Phylogenetic relationship in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK and trnL-trnF sequences. *American Journal of Botany* 89(2): 312–326.
- Paulino-Neto, H.F. 2016. Floral Biology of *Rhipsalis paradoxa* (Cactaceae: Cactoideae) in Atlantic Mesófilia Semidecidua, Serra do Japi, Jundiaí–SP. *Journal of Ecosystem & Ecography* 6(4): 221-224.
- Pond, S.L.K.; Frost, S.D.W.; Muse, S.V. 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21: 676-679.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Reflora. 2017. *Herbário Virtual Reflora*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.herbariovirtualreflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>>. Acesso em 02 de abril de 2017.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19(12):1572-4.
- Sánchez, D.; Grego-Valencia, D.; Terrazas, T.; Arias, S. 2015. How and why does the areole meristem move in *Echinocereus* (Cactaceae)? *Annals of Botany* 115: 19–26, 2015.
- Schumann, K. 1890. Cactaceae. In: *Flora Brasiliensis*. Martius, K.F.P.; Eichler, A.G. & Urban, I. (Orgs).4(2): 184-322.

Secorun, A.C. & Souza, L.A. 2011. Morphology and anatomy of *Rhipsalis cereuscula*, *Rhipsalis floccosa* subsp. *hohenauensis* and *Lepismium cruciforme* (Cactaceae) seedlings. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 131-143.

Silva, C.H.G. 2012. Anatomia e evolução de caracteres anatômicos selecionados do caule do gênero *Rhipsalis* Gaertner (Cactaceae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 47p.

Silva, C.H.G.; Calvente, A.; Soller, A.; Maranhão, L.T.; Boeger, M.R.T. & Soffiatti, P. 2013. Anatomia de *Rhipsalis* subgênero *Erythrorhipsalis* A. Berger (Rhipsalideae, Cactaceae). *Iheringia, Sér. Bot.* 68(2): 249-259. Taylor, N.; Olsthorn, G. Zappi, D.; Khew, G. & Quandt, D. 2014. A remarkable new *Rhipsalis* (Cactaceae) from eastern Brazil. *Bradleya* 32: 2-12.

Taylor, N.P. & Zappi, D. 2004. *Cacti of eastern Brazil*. Royal Botanic Gardens, London. 499p.

Taylor, N.P. 1997. Cactaceae. In: Oldfield, S. (Ed.). *Cactus and succulent plants: status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group. Gland, Switzerland e Cambridge, UK. Pp. 17-20.

Thiers, B. 2016 [continuously updated]. *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>>. Acesso em 27 de outubro de 2016.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Hoggins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.

Wallace, R. S. 1995. Molecular systematic study of the Cactaceae: using chloroplast DNA variation to elucidate cactus phylogeny. *Bradleya* 13: 1–12.

Wicke, S. & Quandt, D. 2009. Universal primers for the amplification of the plastid trnK/matK region in land plants. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66: 285–288.