

Título do projeto de pesquisa: **Filogeografia de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae)**

Responsável: Dr. Fábio Pinheiro (Instituto de Botânica)

Colaboradores: Dr. Fábio de Barros (Instituto de Botânica)

Colaboradores: Dra. Clarisse Palma da Silva (Instituto de Botânica)

Introdução

Estudos filogeográficos têm por objetivo investigar os processos evolutivos responsáveis pela distribuição de linhagens genealógicas num contexto geográfico, especialmente em grupos de espécies próximas (Avise 2000). Para que os padrões geográficos de distribuição de linhagens sejam corretamente interpretados, um enfoque multidisciplinar é necessário, integrando princípios de biogeografia, genética de populações e hipóteses filogenéticas (Avise et al. 1987).

Os trabalhos realizados com populações e espécies próximas assumem papel de grande importância na caracterização dos processos evolutivos que, no longo prazo, geram os padrões reconhecidos nas análises realizadas em níveis taxonômicos superiores. Como exemplo, podemos citar a série de estudos realizados com orquídeas européias do gênero *Dactylorhiza* (Pillon et al. 2006) e *Orchis* (Aceto et al. 1999), onde as hipóteses filogenéticas disponibilizaram o reconhecimento de subgrupos de espécies que puderam ser investigados num contexto filogeográfico. Neste sentido, diversas populações foram analisadas com o objetivo de clarificar os processos evolutivos e demográficos envolvidos na diversificação de espécies e linhagens, como poliploidia e hibridação (Hedrén et al. 2008), e fatores demográficos originados pela dinâmica histórica de oscilações climáticas (Cozzolino et al. 2003).

Neste estudo a espécie *Epidendrum secundum* Jacq. será utilizada como modelo biológico. Esta espécie ocorre em toda a América do Sul, em áreas montanhosas sob influência de clima tropical. Pela sua ampla distribuição geográfica, a espécie é um modelo ideal para estudos filogeográficos.

Objetivos

O objetivo principal deste estudo é investigar o efeito das flutuações climáticas históricas e a influência das retrações e expansões florestais nos padrões de diversidade genética de populações de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae).

Os objetivos específicos são:

1. Investigar como a distribuição geográfica influencia a estrutura genética das espécies e populações, e os mecanismos de diversificação envolvidos na diversificação do grupo, utilizando uma abordagem filogeográfica;
2. Avaliar o papel das contrações e expansões históricas da Mata Atlântica na diversificação desta espécie, e identificar os processos demográficos históricos responsáveis pela arquitetura genética observada nas populações atuais;
3. Avaliar o efeito de prováveis barreiras geográficas e gradientes latitudinais na variabilidade genética da espécie;
4. Contribuir para a conservação desta espécie e dos biomas onde elas estão inseridas (Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado), com a definição de áreas prioritárias para conservação, tendo como referência a estruturação genética das populações.

Material e Métodos

Coletas de indivíduos em populações naturais serão realizadas em áreas de Mata Atlântica e Cerrado, nas seguintes unidades de conservação: Parque Estadual de Vila Velha, Parque Estadual do Guartelá, Parque Estadual do Pico do Marumbi, Parque Estadual do Cerrado, Parque Estadual do Pico do Paraná, APA Estadual de Guaratuba, APA Estadual do Piraquara. Em cada localidade, serão coletadas amostras de folhas de cerca de 20 indivíduos. Duas amostras de cada localidade serão prensadas e depositadas para registro de herbário nos Herbários SP (Instituto de Botânica, São Paulo) e MBM (Jardim Botânico de Curitiba).

As etapas que envolvem as análises moleculares, como extração de DNA, amplificação de regiões de cloroplasto contendo microsatélites e interpretação dos eletroferogramas serão baseadas em Pinheiro et al. (2008). Serão utilizadas cinco regiões de cloroplasto (Epcp-01, 02, 04, 08 e 09) descritas por Pinheiro et al. (2009) para genotipar as amostras coletadas.

A diversidade genética das populações será caracterizada através da proporção de locus polimórficos, média de alelos por locus e heterozigotidade média esperada (H_e), com o uso do programa ARLEQUIN (Excoffier et al. 2005). Haplótipos serão construídos com base nos resultados obtidos para os cinco loci.

Os haplótipos serão analisados por máxima parcimônia utilizando o software NETWORK (Bandell et al. 1999), que constrói uma rede de haplótipos que representa a

hipótese filogenética de haplótipos menos complexa. A rede de haplótipos será analisada utilizando o método hierárquico proposto por Templeton (nested clade analysis, Templeton et al. 1987). A associação entre localidades geográficas e clados hierárquicos será detectada usando o programa GEODIS v. 2.4 (Posada et al. 2000), e os resultados serão interpretados utilizando a última chave de inferência de Templeton (2004).

A variância nas frequências gênicas será subdividida em vários componentes hierarquicamente inclusivos, como a variância entre espécies, entre regiões geográficas, entre populações, e a existência de grupos geograficamente homogêneos e geneticamente diferenciados será testada com a análise espacial de variância molecular, utilizando o programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al. 2002).

Eventos demográficos de expansão populacional serão investigados com o teste de neutralidade de Tajima D (Tajima, 1989), e com o método de diferenças par-a-par (distribution of pairwise differences – mismatch distribution), ambos implementados no software ARLEQUIN.

Resultados esperados

A caracterização da estrutura filogeográfica de populações de *Epidendrum secundum* distribuídas em diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga) permitirá um entendimento profundo da influência que oscilações climáticas históricas tiveram sobre os organismos neotropicais. A identificação de populações com altos níveis de diversidade genética e estabilidade demográfica pode indicar que estas populações estão localizadas em regiões que não sofreram a influências destas oscilações, caracterizando refúgios onde a biodiversidade permaneceu sem alterações expressivas durante períodos glaciais/interglaciais.

Referências

- Aceto S, Caputo P, Cozzolino S, Gaudio L, Moretti A (1999) Phylogeny and Evolution of Orchids and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 67-76.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between

- population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Bandelt H-J, Forster P, Roehl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- Cozzolino S, Noce ME, Musacchio A, Widmer A (2003) Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 90, 1681-1687.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571-2581.
- Excoffier L, Laval LG, Schneider S (2005) ARLEQUIN, version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Hedrén M, Nordström S, Ståhlberg D (2008) Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata*/maculate complex (Orchidaceae) in Scandinavia. *Molecular Ecology*, 17, 5075-5091.
- Pillon Y, Fay MF, Shipunov AB, Chase MW, (2006) Species diversity versus phylogenetic diversity: A practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Biological Conservation*, 129, 4-13.
- Pinheiro F, Santos MO, Palma-Silva C, Barros F, Meyer D, Salatino A, Souza AP, Cozzolino S (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Epidendrum puniceoluteum*, an endemic orchid from the Atlantic Rainforest. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1114-1116.
- Pinheiro F, Palma-Silva C, Barros F et al. (2009) Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae). *Conservation Genetics Resources*, 1, 505-511.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000) GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9, 487-488.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and

DNA sequence data: Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117, 343-351.

Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13, 789-809.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 09/15052-0)

Site: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/40621/filogeografia-especies-epidendrum-orchidaceae-integrantes/>