



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76

Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2025

Produção de sequências plastidiais em espécies de *Pariana* Aubl. (Poaceae, Olyreae), como subsídio para entender a sistemática e a evolução do gênero

Lara Mascarenhas Souza¹; Iasmin Laiane C. Oliveira²; Reyjane P. Oliveira³

1.Bolsista PIBIC/CNPq, AGRONOMIA, e-mail: larams0605@gmail.com

2.Coorientadora, Programa de Pós-graduação em Botânica/UEFS, e-mail: iasminlaiane@gmail.com

3.Orientadora, DCBIO/UEFS, e-mail: rpatricia@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Bambus, *Pariana*, PCR.

1 INTRODUÇÃO

Os bambus são monocotiledôneas muito importantes econômica e ecologicamente, incluídos em Bambusoideae, uma das doze subfamílias de Poaceae (Gramineae), incluindo mais de 1680 espécies em ca. 127 gêneros (Clark & Oliveira 2018). Atualmente, Bambusoideae encontra-se dividida em três tribos, sendo uma delas Olyreae, que compreende os bambus herbáceos (Clark et al., 2015; Clark & Oliveira, 2018). Esta é essencialmente florestal e quase exclusiva da região Neotropical, ocorrendo no Brasil, nas florestas Atlântica e Amazônica, com muitas espécies endêmicas (Oliveira et al., 2011). São plantas monoicas, com ampla variação nos caracteres vegetativos, enquanto os reprodutivos são mais constantes, acarretando a presença de gêneros fracamente delimitados. São reconhecidas 125 espécies distribuídas em 24 gêneros (Clark et al. 2015; Clark & Oliveira, 2018; I. Oliveira et al., 2020; R. Oliveira et al., 2020, 2024), a maioria deles incluindo um pequeno número de espécies.

Apesar do avanço no entendimento das relações entre bambus nos últimos anos, como parte do consórcio mundial BPG (Bamboo Phylogeny Group), ainda há muito a ser esclarecido. Um dos grupos-alvo, a subtribo Parianinae, é muito expressiva em número de espécies e historicamente envolvia apenas os gêneros *Pariana* Aubl. e *Eremitis* Döll. As espécies de *Pariana* previamente consideradas como ocorrentes na Mata Atlântica da Bahia foram transferidas para o gênero *Parianella* (Ferreira et al. 2013) e as duas demais linhagens, envolvendo *Pariana* (exclusivo da Amazônia e América Central) e *Eremitis* (exclusivo da Mata Atlântica) foram consideradas irmãs. Isso foi feito como parte da tese de Ferreira (2012) no PPGBOT/UEFS, sendo a taxonomia e a evolução de *Eremitis* estudadas usando espaçadores nucleares e plastidiais, recuperando três linhagens fortemente sustentadas, duas delas correspondendo a membros do gênero *Pariana*, parafilético em relação a *Eremitis* (Ferreira et al. 2019). Recentemente, outro novo gênero foi publicado em Parianinae, denominado *Aemulanthus* R.P.Oliveira & F.M.Ferreira, o qual é endêmico do Espírito Santo e morfologicamente relacionado a *Parianella* (Oliveira et al. 2024).

Esses estudos foram baseados em uma grande representatividade de amostras de *Eremitis* (17 spp. na atualidade), em detrimento de um pequeno número de *Pariana*, mesmo com sua alta diversidade (ca. 36 spp.) e complexidade que sua taxonomia representa. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar extrações do DNA e produzir sequências do maior número possível de amostras de *Pariana*, para futura inserção das mesmas em filogenias preexistentes, a fim de ampliar o conhecimento preliminar sobre as relações nesse gênero, subsidiando discussões mais consistentes sobre sistemática e evolução desta importante linhagem de bambus herbáceos.

2. METODOLOGIA

Para o presente estudo foram utilizadas 37 amostras de DNA de *Pariana* disponíveis no Banco de DNAs do Laboratório de Sistemática Molecular em Plantas da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAMOL/UEFS), além de seis amostras de folhas coletadas e preservadas em sílica gel, provenientes de coletas recentes na região Amazônica, totalizando 43 amostras analisadas. A extração de DNA genômico foi realizada a partir de folhas preservadas em sílica, utilizando o protocolo de Doyle & Doyle (1987) adaptado para microtubos. Os procedimentos moleculares incluíram várias etapas para otimizar a pureza e o rendimento do DNA, minimizando a contaminação por polissacarídeos e compostos fenólicos. Para a quantificação do DNA total, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado e as amostras de DNA foram misturadas com corante e o marcador Lambda HindIII (200 ng), sendo aplicadas no gel para a corrida eletroforética, que durou 40 minutos a 80 W. O gel foi então documentado no fotodocumentador UV L-Pix (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil).

A amplificação do DNA foi realizada por meio de reações de PCR, focando em regiões específicas do DNA previamente analisadas em Olyreae, incluindo o gene plastidial *ndhF*, o íntron *rpl32* e os espaçadores *trnD-trnT*, *trnS-trnG*, além do espaçador interno transcrito (ITS) do genoma nuclear ribossomal. Diferentes primers e programas de termociclagem foram usados para cada região, com base em protocolos de R. Oliveira et al. (2014, 2020), Ferreira et al. (2019) e I. Oliveira et al. (2020). As amostras foram amplificadas em gel de agarose por 15 minutos a 80 W. Finalmente, a qualidade do DNA foi verificada no nanodrop (espectrofotômetro UV-Vis), que mediu concentração e pureza.

As amostras foram precipitadas com o protocolo PEG, que envolveu a limpeza das amostras com PEG 20% para precipitação do DNA e etanol 80% para limpeza e envio para sequenciamento, o que será feito em uma etapa posterior, após certificação sobre a identidade de todas as amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 43 amostras de DNA do gênero *Pariana*, correspondentes, em princípio, a 14 espécies: *P. campestris* Aubl., *P. interrupta* Tutin., *P. ulei* Pilg., *P. lanceolata* Trin., *P. velutina* Swallen., *P. sociata* Swallen., *P. nervata* Swallen., *P. simulans* Tutin., *P. zingiberina* Rich. ex Döll., *P. intermedia* Döll., *P. concinna* Tutin., *P. lunata* Ness., *P. stenolemma* Tutin. e *P. gracilis* Döll., além de materiais com identificação duvidosa, que podem representar novos táxons e por isso precisam ser estudados em maiores detalhes. A maioria das amostras apresentou valores de pureza entre 1,7 e 1,9, obtidos a partir do espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific, EUA). Isso indica que a extração de DNA teve qualidade, com valor de absorbância obtido através do cálculo A260/A280, que precisa estar entre 1,8 e 2,0. A concentração de DNA obtida foi considerada satisfatória para as reações de PCR, resultando na amplificação bem-sucedida de três das cinco regiões estudadas. Dentre elas, a análise comparativa da performance dos marcadores testados em *Pariana* revelou que o íntron *rpl32* e os espaçadores *trnD-trnT* e *trnS-trnG* foram amplificados para todas as amostras, sendo 129 amostras no total preparadas para sequenciamento. Isso demonstra que os protocolos utilizados para os PCRs, incluindo a concentração de primers e os programas de termociclagem, foram otimizados com sucesso para os mesmos (Ferreira et al. 2019, Oliveira et al. 2020).

Dentre as amostras analisadas, aquelas correspondentes aos vouchers Oliveira, I.L.C.48, Oliveira, I.L.C.50, Oliveira, I.L.C.51, Oliveira, I.L.C.52, Oliveira, I.L.C.54 e Oliveira, I.L.C.60, tiveram o DNA extraído com sucesso usando o protocolo de Doyle & Doyle (1987) e foram amplificadas pela primeira vez. Porém, estão aqui identificadas apenas em nível de gênero e apresentadas na figura 1.



Figura 1: Representantes de *Pariana* depositados no HUEFS mostrando a diversidade e respectivos vouchers: (A) Oliveira, I.L.C.48, (B) Oliveira, I.L.C.50, (C) Oliveira, I.L.C.51, (D) Oliveira, I.L.C.52, (E) Oliveira, I.L.C.54 e (F) Oliveira, I.L.C.60. Fonte: *SpeciesLink* (2025).

A produção de sequência dessas amostras é de grande importância para os estudos filogenéticos em andamento, considerando que para *Pariana*, menos da metade das espécies teve seu DNA sequenciado até o momento, como visto em outros estudos que buscam preencher lacunas similares. A inclusão de novas sequências para complementar as filogenias existentes do grupo (Ferreira et al. 2019; Oliveira et al. 2024) permitirá uma melhor compreensão da identidade e das relações internas do gênero. Afirma-se que esses resultados poderiam ter sido ainda mais consistentes, uma vez que durante parte do período da bolsa, o LAMOL passou por reformas estruturais, impactando o cronograma elaborado para as atividades, incluindo o período de treinamento da bolsista nos variados métodos moleculares e na obtenção das sequências. Durante este período de não uso do laboratório, foi possível ampliar a leitura sobre aspectos taxonômicos do grupo (Clark et al. 2015), o que tem dado uma ideia maior sobre a complexidade do mesmo.

O estudo terá continuidade, o que permitirá uma melhor compreensão da identidade e das relações internas do gênero e a comparação dos dados moleculares com aspectos morfológicos subsidiará a delimitação de espécies problemáticas, ampliando o conhecimento sobre a evolução dos bambus herbáceos (Oliveira et al. 2011, Clark & Oliveira 2018) e sobre a diversidade da flora brasileira (Clark & Oliveira 2018), fornecendo uma base importante para estudos futuros, tanto para fins aplicados quanto para a conservação das espécies.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados são fundamentais para ampliar a compreensão sobre taxonomia e evolução de espécies de *Pariana*, membro da subtribo Parianinae, tribo Olyreae. Foram analisadas amostras de DNA de 43 representantes do grupo, com dados moleculares inéditos, inclusive de espécies potencialmente novas para a Ciência. Apesar de muitas delas terem sido coletadas há anos atrás, seu DNA permaneceu preservado, com base nos protocolos utilizados. O trabalho enfrentou problemas consistentes, como a reforma do laboratório e a própria taxonomia do grupo.. Tais atividades terão continuidade, reafirmando a importância dos estudos moleculares para a sistemática dos bambus herbáceos, fornecendo uma base importante para a tomada de decisões taxonômicas e conservacionistas futuras.

5 REFERÊNCIAS

- Clark LG, Londoño X, Ruiz-Sánchez E. 2015.** Bamboo taxonomy and habitat. In: Liese W, Köhl M, eds. *Bamboo: the plant and its uses*. Cham: Springer, 1–30.
- Clark LG, Oliveira RP. 2018.** Diversity and evolution of the New World bamboos (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae, Olyreae). In: Lucas S. (ed.), *Proceedings of the 11th World Bamboo Congress*, Xalapa, Mexico. The World Bamboo Organization, MA, 35–47.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- Ferreira, F. M. 2012.** Filogenia da subtribo Parianinae e sistemática de *Eremitis* Döll (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae). Tese (Doutorado em Botânica), Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
- Ferreira, F.M., R.P. Oliveira, C.A.D. Welker, M.C. Dorea, A.L.C. Lima, I.L.C. Oliveira, F.A.R. Santos, C. Van den Berg, and L.G. Clark. 2019.** Phylogenetic relationships within Parianinae (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae) with emphasis on *Eremitis*: evidence from nuclear and plastid DNA sequences, macromorphology, and pollen ectexine patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 139: 106541.
- Oliveira ILC, Matos AO, Silva C, Carvalho MLS, Tyrrell CD, Clark LG, Oliveira RP. 2020.** Delving deeper into the phylogenetics of the herbaceous bamboos (Poaceae, Bambusoideae, Olyreae): evaluation of generic boundaries within the Parodiolyra/Raddiella clade uncovers a new genus. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1–21.
- Oliveira RP, Clark LG, Schnadelbach AS, Monteiro SHN, Borba EL, Longhi-Wagner HM, Van den Berg C. 2014.** A molecular phylogeny of *Raddia* and its allies within the tribe Olyreae (Poaceae, Bambusoideae) based on noncoding plastid and nuclear spacers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 78: 105–117.
- Oliveira RP, Longhi-Wagner HM, Jardim JG. 2011.** Diversidade e conservação dos bambus herbáceos (Poaceae: Bambusoideae: Olyreae) da Mata Atlântica, Brasil. In: *Anais do Seminário Nacional "Bambu: estruturação da rede de pesquisa e desenvolvimento"*. Brasília: Faculdade de Arquitetura e Urbanismo, Universidade de Brasília, 62–66.
- Oliveira RP, Silva C, Welker CAD, Dórea MC, Oliveira ILC, Vieira JPS, Leite KRB, Clark LG. 2020.** Reinterpreting the phylogenetic position, systematics and distribution of the *Raddia*-*Sucrea* lineage (Poaceae, Olyrinae), with a new monotypic and endangered herbaceous bamboo genus from Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1–27.
- Oliveira, R. P., Ferreira, F. M., Oliveira, I. L., Dórea, M. C., Lima, J. F., Clark, L. G., & Welker, C. A. 2024.** Long-term fieldwork in Brazil helps to unravel the diversity and evolution of the Neotropical Olyreae (Poaceae: Bambusoideae): an unexpected new and threatened genus in Parianinae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, boae017.