

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E  
BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Duroia macrophylla* HUBER (RUBIACEAE) A  
PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES CLOROPLASTIDIAIS E  
NUCLEARES (ITS E MICROSSATÉLITES)**

**JULIANA NASCIMENTO DA SILVA**

**Manaus, Amazonas**

**Setembro, 2022**

**JULIANA NASCIMENTO DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Duroia macrophylla* HUBER (RUBIACEAE) A  
PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES CLOROPLASTIDIAIS E  
NUCLEARES (ITS E MICROSSATÉLITES)**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Jacqueline da Silva Batista**

**Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Cecilia Veronica Nunez**

**Coorientador: Dr. Santiago Linorio Ferreyra Ramos**

**Dissertação apresentada ao  
Instituto Nacional de Pesquisas  
da Amazônia como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Genética,  
Conservação e Biologia Evolutiva**

**Manaus, Amazonas**

**Setembro, 2022**

## ATA DA DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 28 de setembro de 2022, às 14h00 (horário-Manaus) de forma remota, reuniu-se a Banca Julgadora da DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO, composta pelos seguintes Doutores, membros titulares: Daiane Martins Ramos; Adna Cristina Barbosa de Souza e Diego Sotero de Barros Pinangé, tendo como membros suplentes: Tiara Sousa Cabral e Jennifer Souza Tomaz, afim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO da discente, JULIANA NASCIMENTO DA SILVA, intitulada: "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE DUROIA MACROPHYLLA HUBER (RUBIACEAE) A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES CLOROPLASTIDIAIS E NUCLEARES (ITS E MICROSSATÉLITES)". O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Jacqueline da Silva Batista; coorientação da Dra. Cecília Verônica Nunez, ambas do INPA e do Dr. Santiago Linório Ferreyra Ramos da UFAM.


Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

#### CONCEITO FINAL

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Aprovada por unanimidade            | <input type="checkbox"/> Aprovada com "Distinção e Louvor" |
| <input type="checkbox"/> Aprovada por maioria                |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Aprovada com "Distinção" | <input type="checkbox"/> Reprovada                         |

A ATA Foi lavrada e assinada pelos Doutores, membros presentes da Banca Julgadora.

#### BANCA JULGADORA

NOMES	ASSINATURAS
Daiane Martins Ramos - UFAM	
Adna Cristina Barbosa de Sousa - UFPB	<i>AdnaCristinaBarbosa de Sousa</i>
Diego Sotero de Barros Pinangé - UFAM	<i>Diego Sotero P. Pinangé</i>
SUPLENTES	
Tiara Sousa Cabral - INPA	
Jennifer Souza Tomaz - UFAM	



Documento assinado digitalmente

ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

Data: 26/09/2022 15:06:21-0300

Verifique em <https://verificador.ti.br>



**Zelina Estevam dos Santos Torres, Dra.**  
**Chefe da Divisão do Programa de Pós-Graduação - PPG-GCBEV**  
**PO. Nº 577 - INPA/MCTI**

Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEV Art. 62 "Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEV. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEV.

Programas de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - PPG INPA  
Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - PPG GCBEV  
Avenida André Araújo, 2936 - Bairro: Aleixo - Caixa Postal: 478 - CEP: 69.060-001 - Manaus/AM - Fone/Fax: (0xx92) 3643-3344  
e-mail(s): [secretaria.gcbev@posgrad.inpa.gov.br](mailto:secretaria.gcbev@posgrad.inpa.gov.br) - <http://gcbev.inpa.gov.br/>

S586c Silva, Juliana Nascimento da  
Caracterização genética de *Duroia macrophylla* HUBER (Rubiaceae) a partir de marcadores moleculares cloroplastidiais e nucleares (ITS e microssatélites) / Juliana Nascimento da Silva; orientadora Jacqueline da Silva Batista; coorientadores Cecilia Veronica Nunez; Santiago Linorio Ferreyra Ramos. - Manaus:[s. 1.], 2022.

1.7 MB  
94 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação E Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2022.

1. *Duroia macrophylla*. 2. Potencial biotecnológico. I. Batista, Jacqueline da Silva. II. Nunez, Cecilia Veronica. III. Ramos, Santiago Linorio Ferreyra. IV. Título.

CDD 580

**Sinopse:**

O apurú (*Duroia macrophylla*) é uma árvore frutífera que apresenta elevado potencial biotecnológico. Neste trabalho, foi otimizado um protocolo de extração de DNA genômico para a espécie, foi realizada uma prospecção de marcadores moleculares cloroplastidiais (13) e nuclear (ITS) baseados em sequências de DNA e desenvolvimento e caracterização de locos microssatélites, com intuito de serem utilizados em estudos populacionais.

**Palavras-chave:** SSR, DNACp, DNAn.

## **Dedicatória**

*À minha filha Sofia e à minha mãe Mirineia  
Eu amo vocês!*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, a Deus, pela vida e por me conceder vias para o alcance dos meus objetivos a partir de meus merecimentos e de minha determinação.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em especial ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) pela estrutura e todas as condições oferecidas para que fosse possível a realização de etapas fundamentais deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de projetos que custearam o trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudo, inclusive à prorrogação excepcional concedida em decorrência da pandemia.

À Dr<sup>a</sup>. Jacqueline da Silva Batista, pela orientação, confiança, apoio, incentivo desde a iniciação científica e contribuição em minha carreira. Agradeço também pela idealização do projeto de dissertação.

Aos meus coorientadores, Dr<sup>a</sup>. Cecilia Veronica Nunez pelo apoio desde os meus anos iniciais no INPA e pelo auxílio durante todo o mestrado e ao Dr. Santiago Linório Ferreyra Ramos pelos ensinamentos e ideias para a melhoria do trabalho.

Às minhas queridas Kyara Martins Formiga e Giselle Moura Guimarães Marques pelo acolhimento no laboratório, pela paciência e ensinamentos. Muito do que sei sobre as técnicas laboratoriais, é graças a vocês duas.

Ao grupo Pirada: Renato Corrêia Lima, Sabrina Rufino de Lima, Flávia da Silva Fernandes, Ana Caroline da Silva Viana, Andreza Mikeyne Silva da Mota, Tayná Letícia da Paixão Rodrigues e Fabrício Barros de Sousa, pela convivência no laboratório, contribuições, conversas, incentivos, risadas e pela amizade.

Ao Antônio Saulo Cunha Machado e Thalita Zanquetta Luz, pelas valiosas trocas de experiência sobre genética vegetal e pela colaboração para a execução principalmente do segundo capítulo da dissertação.

Ao Carlos Eduardo Marques pela elaboração de fórmulas no excel que facilitaram as elaborações de mapas complexos de genotipagem.

À Alyne Farias e Zeina, por contribuírem para que os usuários do LTBM pudessem realizar suas pesquisas, a partir de seus serviços fundamentais realizados.

À coordenadoria, Dr<sup>a</sup>. Eliana Feldberg e Dr<sup>a</sup>. Gislene Almeida Carvalho- Zilse, à chefe da divisão Dr<sup>a</sup>. Zelina Estevam dos Santos Torres e à secretária Helita Cardoso, todas do PPG-GCBEv.

À minha turma de mestrado de 2019: Suzane Morais, Nasrah Hamdam, Neiva Vasconcelos, pelo companheirismo dentro e fora da sala de aula, nos períodos ou não de disciplinas.

A todos os usuários do LTBM, que de forma passageira ou mais frequentemente, puderam participar de alguma forma de minha formação profissional, acadêmica e pessoal.

Ao mateiro Edmilson pela busca da espécie e pelas coletas realizadas, bem como pelo compartilhamento de conhecimentos morfológicos sobre o apuruí.

À banca de qualificação: Dr. Diego Sotero Barros Pinangé, Dr<sup>a</sup>. Daiane Martins Ramos e Dr<sup>a</sup>. Tiara Sousa Cabral, pelas sugestões de melhoria no trabalho e consequente aprovação do projeto de pesquisa.

À banca de defesa: Dr<sup>a</sup>. Daiane Martins Ramos, Dr<sup>a</sup>. Adna Cristina Barbosa de Sousa e Dr. Diego Sotero Barros Pinangé, pelas sugestões de melhoria da dissertação para a versão final e para os artigos, e também pela aprovação.

À minha filha (Sofia), mãe (Mirineia), avó (Cleide), marido (Carlos) que são os principais responsáveis por eu ter tido forças, determinação, foco e por terem disponibilizado todas as condições para que eu pudesse executar este trabalho. Ainda quero poder retribuí-los e dar muito orgulho a vocês. Amo vocês demais. Estendo os meus agradecimentos à minha tia (Milena) e sogra (Lúcia), que juntamente com minha avó e mãe, fizeram parte da minha rede de apoio e cuidaram tão bem da minha pequena durante minhas ausências, e a todos os integrantes da minha família que de forma direta ou indireta contribuíram com a realização deste sonho coletivo.

Ao objeto deste trabalho, apuruí, o protagonista desta dissertação e que a mim foi concedida a permissão para o desbravamento sobre seus aspectos genéticos moleculares.

O meu muito obrigada a todos vocês,  
Juliana Silva

*“Aprendi com a primavera a deixar-me  
cortar e a voltar sempre inteira.”*

**Cecília Meireles**



## Resumo

O apurú (*Duroia macrophylla*) produz altos teores de metabólitos secundários com potencial bioativo. Levando em consideração essa importância biotecnológica, o objetivo deste trabalho foi caracterizar regiões genômicas a partir de marcadores cloroplastidiais e nucleares (ITS e microssatélites) de *D. macrophylla*. Para isso, foi otimizado um protocolo de extração de DNA protocolo de Doyle e Doyle, 1990. Dentre os oito tratamentos realizados, o tratamento 6 foi o que apresentou maior quantidade de DNA e diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Neste tratamento, a fragmentação ocorreu em fragmentador automático, a digestão do DNA a 60 °C por 30 minutos e a precipitação a 37 °C *overnight*. Os tratamentos 4, 7 e 8 apresentaram valores dentro do intervalo que indicam pureza de DNA em relação a proteínas. A validação do DNA mostrou que todos os tratamentos estavam suscetíveis à amplificação com os diferentes marcadores utilizados, porém apresentaram diferentes taxas de rentabilidade. O DNA diluído de 1:15 apresentou maiores números de ampliações, já que a diluição auxilia na redução da concentração de possíveis inibidores. Para avaliar o polimorfismo, foram selecionadas 13 regiões do genoma cloroplastidial e uma do nuclear (ITS). Foram recuperados 7289 pares de base (pb) do genoma cloroplastidial e 607 pb do genoma nuclear. Detectaram-se mutações em três dos 14 marcadores. As sequências de ITS de *D. macrophylla* representaram quatro haplótipos, e os índices de diversidade genética mostraram-se superiores para o marcador ITS relacionado aos cloroplastidiais. O número de sítios polimórficos no nível interespecífico variou de quatro a 29 para cinco marcadores. Os valores de distância genética para o ITS no nível intraespecífico variaram de 0,002 a 0,007% e no interespecífico de 0,015 a 0,065%. O BlastN e BoldSystems mostraram maiores percentuais de similaridade com outras espécies de Rubiaceae. O BlastX permitiu o alcance de resultados para 11 dos 14 marcadores. Os diferentes marcadores oferecem resultados diversificados quando se trata de distância genética entre espécies de *Duroia*, e no nível cogenérico, alguns resultados confirmam o que foi relatado na literatura. O marcador ITS apresentou maiores níveis de polimorfismo, enquanto que o N e T3 baixos níveis e os outros 11 marcadores apresentaram-se monomórficos. Desta maneira, o marcador ITS pode ser o marcador baseado em sequências de DNA mais adequado para realização de estudos envolvendo marcadores moleculares. Os microssatélites foram obtidos a partir da construção de uma biblioteca genômica enriquecida, na qual, o motivo de repetição mais frequente foi do tipo dinucleotídeo (80,6%) e quanto à natureza de repetição, o mais frequente foi do tipo perfeito (91,7%). Foram desenhados 30 pares de *primers* e caracterizados 24 locos microssatélites (22 polimórficos e 2 monomórficos) em 23 a 36 espécimes. O número de alelos variou de um a nove, com um total de 118. A heterozigosidade observada e esperada variou de 0,143 a 0,844 e 0,135 a 0,837, respectivamente. Seis locos não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg, não foi detectado desequilíbrio de ligação nem *dropout* em nenhum dos locos. O coeficiente de endogamia variou de -0,413 a 0,555 e o conteúdo de polimorfismo informativo variou entre 0,124 a 0,803. Os marcadores microssatélites desenvolvidos poderão ser utilizados no acesso a variabilidade genética da espécie, devido às taxas de polimorfismo que apresentaram. Além disso, poderão subsidiar políticas de conservação e manejo para a espécie e oferecer possibilidade de amplificação heteróloga.

## Abstract

Apurú (*Duroia macrophylla*) produces high levels of secondary metabolites with bioactive potential, taking into account this biotechnological importance, the objective of this work was to characterize polymorphic genomic regions from chloroplast and nuclear markers (ITS and microsatellites) of *D. macrophylla*. For this, a DNA extraction protocol by Doyle and Doyle, 1990 was optimized. Among the eight treatments performed, treatment 6 was the one with the highest amount of DNA and a significant difference in relation to the other treatments. In this treatment, fragmentation occurred in an automatic shredder, DNA digestion at 60 °C for 30 minutes and precipitation at 37 °C *overnight*. Treatments 4, 7 and 8 showed values within the range that indicate purity of DNA in relation to proteins. DNA validation showed that all treatments were susceptible to amplification with the different markers used, but showed different rates of return. The 1:15 diluted DNA showed higher numbers of amplifications, since the dilution helps to reduce the concentration of possible inhibitors. To evaluate the polymorphism, 13 regions of the chloroplast genome and one of the nuclear genome (ITS) were selected. 7289 base pairs (bp) of the chloroplast genome and 607 bp of the nuclear genome were recovered. Mutations were detected in three of the 14 markers. The *D. macrophylla* ITS sequences represented four haplotypes, and the genetic diversity indexes were higher for the ITS marker related to chloroplasts. The number of polymorphic sites at the interspecific level ranged from four to 29 for five markers. Genetic distance values for ITS at the intraspecific level ranged from 0.002 to 0.007 and at the interspecific level from 0.015 to 0.065. BlastN and BlastX showed higher percentages of similarity with other Rubiaceae species. BlastX allowed achieving results for 11 of the 14 markers. The different markers offer different results when it comes to genetic distance between *Duroia* species, and at the cogenetic level, some results confirm what has been reported in the literature. The ITS marker showed higher levels of polymorphism, while N and T3 had low levels and the other 11 markers were monomorphic. In this way, the ITS marker may be the most suitable marker based on DNA sequences for carrying out population studies. The microsatellites were obtained from the construction of an enriched genomic library, in which the most frequent repetition motif was of the dinucleotide type (80.6%) and regarding the nature of repetition, the most frequent was of the perfect type (91, 7%). We designed 30 pairs of primers and characterized 24 microsatellite loci (22 polymorphic and 2 monomorphic) in 23 to 36 specimens. The number of alleles ranged from one to nine, with a total of 118. Observed and expected heterozygosity ranged from 0.143 to 0.844 and 0.135 to 0.837, respectively. Six loci did not show Hardy-Weinberg equilibrium, neither linkage disequilibrium nor dropout was detected in any of the loci. The inbreeding coefficient ranged from -0.413 to 0.555 and the informational polymorphism content ranged from 0.124 to 0.803. The developed microsatellite markers could be used to access the genetic variability of the species, due to the polymorphism rates they presented. In addition, they will be able to subsidize conservation and management policies for the species and offer the possibility of heterologous amplification.

## Sumário

1. Introdução geral .....	1
1.1.Família Rubiaceae .....	1
1.2.Gênero <i>Duroia</i> .....	2
1.3. <i>Duroia macrophylla</i> .....	3
1.4.Marcadores Moleculares.....	6
1.4.1. Marcadores Moleculares Cloroplastidiais .....	6
1.4.2. Marcadores Moleculares Microssatélites .....	7
1.5.Variabilidade Genética.....	9
2. Objetivos.....	10
2.1.Objetivo geral .....	10
2.2.Objetivos específicos.....	10
Capítulo I - Otimização do protocolo de extração de DNA do apuruí ( <i>Duroia macrophylla</i> Huber): uma frutífera amazônica de importância biotecnológica .....	11
Resumo .....	12
1. Introdução.....	13
2. Material e métodos .....	15
3. Resultados.....	18
4. Discussão.....	24
Capítulo II - Prospecção de marcadores moleculares para o estudo da variabilidade genética de <i>Duroia macrophylla</i> Huber (Rubiaceae) .....	28
Resumo .....	29
1. Introdução.....	30
2. Material e métodos .....	31
3. Resultados.....	37
4. Discussão.....	48
Capítulo III - Marcadores de DNA para <i>Duroia macrophylla</i> Huber (Rubiaceae): Isolamento e caracterização de locos microssatélites de uma frutífera amazônica de importância biotecnológica. ....	54
Resumo .....	55
1. Introdução.....	56
2. Material e métodos .....	57
3. Resultados.....	59
4. Discussão.....	63
Conclusões gerais .....	65
Referências .....	67

## Lista de tabelas

### Capítulo I

Tabela 1 - Tratamentos referente às oito modificações no protocolo de extração de DNA genômico (Doyle e Doyle, 1990) nas etapas de fragmentação e digestão do material biológico e precipitação do DNA, baseadas em um protocolo já estabelecido e comumente utilizado em laboratório.....	16
Tabela 2 - Condições para amplificação de regiões genômicas de <i>Duroia macrophylla</i> .....	18
Tabela 3 - Média das concentrações das amostras de DNA genômico de <i>Duroia macrophylla</i> extraídos a partir de oito tratamentos realizados em triplicata e das razões das absorvâncias $A_{260}/A_{230}$ e $A_{260}/A_{280}$ com os respectivos desvios padrões. ....	19
Tabela 4 - Análises de variância para as variáveis Esp, Flu, Ab1 e Ab2, dos tratamentos de extração de DNA genômico para o apurú ( <i>Duroia macrophylla</i> ).....	20
Tabela 5 - Médias das variáveis Esp, Flu, Ab1 e Ab2, dos tratamentos de extração de DNA para apurú ( <i>Duroia macrophylla</i> ).....	21
Tabela 6 - Quantitativo de amplificações obtidas para os marcadores moleculares <i>rps16 íntron</i> e <i>matK</i> em quatro diferentes concentrações de DNA (não diluído, diluído 1:5, 1:10 e 1:15), e para o ITS em duas concentrações de DNA (não diluído e 1:15) com demonstrativo do total de amplificações por concentração e por tratamento. ....	22

### Capítulo II

Tabela 1 - Marcadores moleculares utilizados nas amplificações via PCR de 10 a 15 espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> , destacando seus respectivos pares de primers e perfis de amplificação. ....	32
Tabela 2 - Marcadores cloroplastidiais referentes a regiões não codificadoras com seus respectivos códigos e primers disponibilizados no trabalho de Shaw et al. (2007) utilizados na amplificação e sequenciamento de DNA.....	33
Tabela 3 - Acesso às sequências de DNA obtidas a partir dos bancos de dados NCBI e BoldSystems, com a espécie, marcador e número de acesso correspondentes, bem como a quais análises genéticas as sequências foram submetidas. ....	35
Tabela 4 - Tamanho dos fragmentos recuperados, número de amostras de <i>Duroia macrophylla</i> sequenciadas (N) e detecção de mutação para 14 marcadores moleculares oriundos do genoma nuclear ou cloroplastidial.....	37
Tabela 5 - Índices de diversidade genética no nível intraespecífico para espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> obtidos a partir das sequências nucleotídicas dos marcadores moleculares ITS e N e no nível interespecífico entre sequências de <i>D. macrophylla</i> e de outras espécies de <i>Duroia</i> depositadas no NCBI para cinco marcadores: ITS ( <i>D. aquatica</i> , <i>D. eriopila</i> e <i>D. hirsuta</i> ), <i>matK</i> ( <i>D. eriopila</i> ), <i>rbcL</i> ( <i>D. aquatica</i> , <i>D. eriopila</i> , <i>D. hirsuta</i> e <i>D. longiflora</i> ) e <i>rps16 íntron</i> ( <i>D. eriopila</i> e <i>D. hirsuta</i> ). ....	39
Tabela 6 - Alinhamento nucleotídico com os sítios polimórficos observados em sequências de DNA dos marcadores ITS, <i>matK</i> , <i>psbA-trnH</i> , <i>rbcL</i> e <i>rps16 íntron</i> , depositadas no NCBI, para <i>Duroia macrophylla</i> e outras espécies de <i>Duroia</i> .....	40
Tabela 7 - Matriz de distância genética (%) corrigida (K2P) par a par utilizando sequências de DNA de ITS no nível intraespecífico de 15 espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> e interespecífico com as espécies <i>D. aquatica</i> , <i>D. eriopila</i> e <i>D. hirsuta</i> obtidas a partir do NCBI. Em negrito, os valores referentes ao desvio padrão.....	41

Tabela 8 - Percentual de similaridade genética observada em sequências de DNA de 14 marcadores de <i>Duroia macrophylla</i> depositadas no NCBI e de <i>matK</i> e <i>rbcL</i> depositadas no BoldSystems .....	43
Tabela 9 - Percentual de similaridade genética de sequências de DNA de 14 marcadores de <i>Duroia macrophylla</i> obtidas na análise de BlastX no NCBI. Foram encontrados resultados para 11 dos 14 marcadores. ....	44
Tabela 10 - Tamanho dos fragmentos em pares de base obtidos para os nove marcadores não codificadores de Shaw et al. (2007), com seus respectivos tamanhos esperados e suas variações. ....	49

### Capítulo III

Tabela 1 - Caracterização de 24 locos microssatélites em 23-36 espécimes desenvolvidos para <i>Duroia macrophylla</i> coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-AM.....	62
Tabela 2 - Caracterização de microssatélites desenvolvidos para outras nove espécies pertencentes à Família Rubiaceae, comparada à caracterização realizada para <i>Duroia macrophylla</i> realizada neste trabalho. ....	64

## Lista de figuras

### Introdução geral

Figura 1 - Mapa de calor representativo da distribuição geográfica de espécies pertencentes à família Rubiaceae. Fonte: Tropicos (2022). .....	1
Figura 2 - Mapa de calor representativo da distribuição geográfica de espécies pertencentes ao gênero <i>Duroia</i> . Fonte: Tropicos (2022). .....	3
Figura 3 - <i>Duroia macrophylla</i> . A- Aspecto geral da árvore; B- Detalhe das folhas com o fruto; C- Flor; D- Detalhe da estípula. Fonte: Silva (2019) A, B; Ribeiro et al (1999) C; Martins (2014)D. ....	4
Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie <i>Duroia macrophylla</i> Huber (Rubiaceae). Fonte: GBIF (2021). ....	4
Figura 5 - Características morfológicas de <i>Duroia macrophylla</i> . A - Ramo com folha ternada e estípula; B - Estípula trisulcada; C – Inflorescência; D – Antera; E - Estilete bífido; F - Fruto com cálice persistente. Fonte: Nascimento (2013). ....	5
Figura 6 - Organização gênica do genoma do cloroplasto de <i>Coffea arabica</i> L. (Rubiaceae) com destaque das repetições invertidas (IR's), da região grande (LSC) e da região pequena de cópia única (SSC). Genes pertencentes a diferentes grupos funcionais são classificados com diferentes cores e os que estão representados no interior do círculo são transcritos em sentido horário e os que estão no exterior no círculo são transcritos no sentido anti- horário (modificado de Mekbib et al. 2020). ....	7

### Capítulo 1

Figura 1 - Diferenças entre as médias de concentração de DNA genômico extraído com oito diferentes tipos de tratamento de um protocolo (T1 a T8), quantificada por espectrofotometria (NanoDrop) e fluorometria (Qubit). ....	21
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de DNA genômico de <i>Duroia macrophylla</i> , a partir de oito tratamentos diferentes (T1 a T8) realizados em triplicata e o DNA do <i>fago lambda</i> (Fago $\lambda$ ) nas concentrações de 50, 100 e 150 ng, respectivamente. ....	22

### Capítulo II

Figura 1 - Representação das 13 regiões nucleotídicas sequenciadas do genoma cloroplastidial de <i>Duroia macrophylla</i> , totalizando 7289 pb, levando em consideração a localização no referido genoma de <i>Coffea arabica</i> (Rubiaceae). ....	37
Figura 2 - Rede de haplótipos de <i>Duroia macrophylla</i> com sequências nucleotídicas do marcador ITS. Na rede, os círculos representam os quatro haplótipos (I a IV) com tamanhos proporcionais ao número de espécimes que são ligados por ramos e os traços nos ramos representam as mutações entre os haplótipos. ....	38
Figura 3 - Árvore de distância genética <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) com espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> e de três espécies de <i>Duroia</i> ( <i>D. aquatica</i> , <i>D. eriopila</i> e <i>D. hirsuta</i> ) cujas sequências foram obtidas no NCBI com o marcador ITS. Valores de suporte de <i>bootstrap</i> entre 81 e 94. ....	45
Figura 4 - Árvore de distância genética <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) com espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> e de <i>D. eriopila</i> cuja sequência foi obtida no NCBI com o marcador <i>matK</i> . ....	45

Figura 5 - Árvore de distância genética <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) com espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> e de quatro espécies de <i>Duroia</i> ( <i>D. aquatica</i> , <i>D. eriopila</i> , <i>D. hirsuta</i> e <i>D. longiflora</i> ) cujas sequências foram obtidas no NCBI com o marcador <i>rbcL</i> . Valores de <i>bootstrap</i> entre 47 e 66. ....	46
Figura 6 - Árvore de distância genética <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) com espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> e de cinco espécies que apresentaram maiores níveis de similaridade genética com a mesma a partir da busca no BlastN- NCBI com os marcadores <i>matK</i> e <i>rbcL</i> concatenados. Valores de suporte de <i>bootstrap</i> entre 63 e 84. ....	47
Figura 7 - Árvore de distância genética <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) com espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> , e de <i>D. eriopila</i> e das cinco espécies que apresentaram maiores níveis de similaridade genética com <i>D. macrophylla</i> a partir da busca no BoldSystems com o marcador <i>matK</i> . Valores de <i>bootstrap</i> entre 44 e 98. ....	47
Figura 8 - Árvore de distância genética <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) com espécimes de <i>Duroia macrophylla</i> e quatro espécies cogenéricas ( <i>D. aquatica</i> , <i>D. eriopila</i> , <i>D. hirsuta</i> e <i>D. longiflora</i> ) e das cinco espécies que apresentaram maiores níveis de similaridade genética com <i>D. macrophylla</i> a partir da busca no BoldSystems com o marcador <i>rbcL</i> . Valores de suporte de <i>bootstrap</i> entre 43 e 88. ....	48

### Capítulo III

Figura 1- Caracterização de 30 locos microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> quanto ao motivo de repetição. ....	60
Figura 2 - Caracterização de 30 locos microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> quanto à natureza de repetição. ....	60
Figura 3 - Motivo de repetição do tipo dinucleotídeo mais frequente encontrado nos microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> . ....	61

## 1. Introdução geral

### 1.1 Família Rubiaceae

Rubiaceae Juss. é a segunda maior Família com maior número de espécies no grupo das Angiospermas, estando atrás apenas da Família Fabaceae (Leguminosae) (Cardoso et al. 2017). Filogeneticamente está dividida em três subfamílias (Rubioideae, Ixoroideae e Cinchonoideae) e 42 tribos (Bremer 2009). Estão incluídos, aproximadamente, 650 gêneros e mais de 13.000 espécies (MOBOT 2022). No Brasil ocorrem cerca de 120 gêneros e 1.400 espécies, sendo que 707 são endêmicas (Flora do Brasil 2022).

A família Rubiaceae é nativa, porém não é endêmica do Brasil, ocorrendo também em outros países do continente Sul-Americano, América do Norte, África, Ásia e Oceania (Barbosa et al. 2015). Sua distribuição geográfica é concentrada, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais, apresentando poucas espécies nas áreas temperadas e frias da Europa assim como, na região norte do Canadá (Judd et al. 2002) (Figura 1).

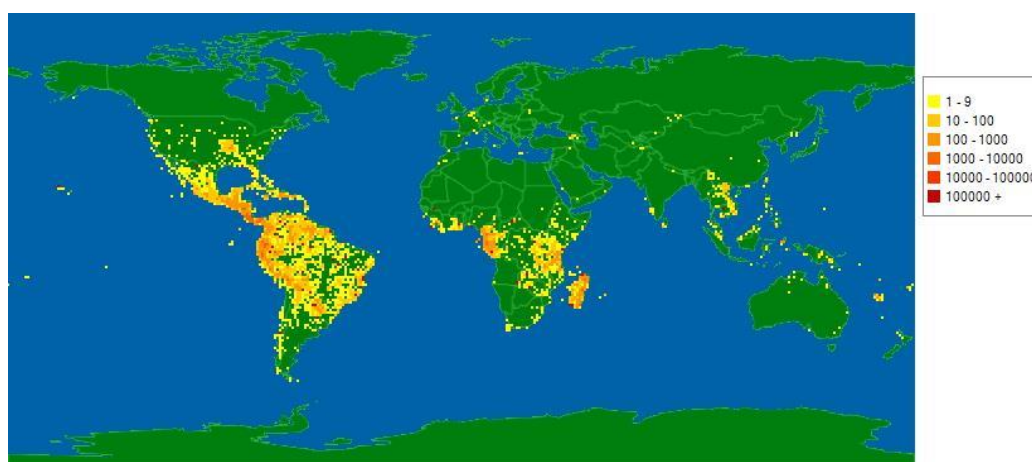


Figura 1 - Mapa de calor representativo da distribuição geográfica de espécies pertencentes à família Rubiaceae. Fonte: Tropicos (2022).

Esta família é destacada por constituir espécies produtoras de metabólitos secundários com potencial farmacológico que originam diversos fármacos (Martins e Nunez 2015, Mesquita et al. 2015). Os metabólitos secundários podem ser utilizados como marcadores taxonômicos para gêneros e subfamílias (Farias 2006). Esses compostos fitoquímicos são considerados ferramentas para a caracterização, descrição e classificação de espécies de plantas, ou seja, ajudam na caracterização de determinado grupo botânico (Mabberley 1997).

Como exemplo de espécies que apresentam potencial biotecnológico, pode-se destacar a espécie *Psychotria myriantha* Mull. Arg., a partir da qual foram isoladas e testadas substâncias da classe dos alcaloides que indicaram ação anti-inflamatória, efeito analgésico e atuação no



sistema nervoso central, devido a substâncias estarem relacionadas a tratamentos de doenças neurodegenerativas e distúrbios neurológicos (Farias 2006).

Dentre outros exemplos de substâncias bioativas, incluem-se: a cafeína que foi isolada do café (*Coffea arabica* L.) e é utilizada em diversos medicamentos, a emetina (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich. com atividade emética e anti-amebicida, a quinidina (*Cinchona ledgeriana* Moens.) usada como antiarrítmico, quinina (*Cinchona ledgeriana*) utilizada por suas propriedades antimalárica e tônica (Cordell et al. 2001). Além disso, é representada por espécies de importância econômica como o café (*Coffea arabica*) (Oliveira 2009) e o jenipapo (*Genipa americana* L.) (Ruzza et al. 2020).

## 1.2 Gênero *Duroia*

*Duroia* L. F. tem origem nativa, porém não é endêmico do Brasil e as espécies pertencentes a este gênero possuem hábito designado como arvoretas ou arbustos (Taylor et al. 2004) e quando árvores, podem apresentar substrato aquático ou terrícola (Zappi 2015).

Bremer e Eriksson (2009) afirmam que este gênero é pertencente à subfamília Ixoroideae e à tribo Gardenieae. Entretanto, um estudo mais recente no qual foi realizada uma reconstrução filogenética utilizando cinco regiões do DNA plastidial, indica que *Duroia* pertence à tribo Cordiereae (Mouly et al. 2014).

A distribuição geográfica do gênero ocorre desde a América Central até América do Sul, sendo representado por 35 espécies neotropicais (Taylor et al. 2004) (Figura 2). Estudos de filogenia molecular mostram que os gêneros *Duroia* e *Amaioua* Aubl. são muito similares geneticamente, dificultando assim a diferenciação entre eles (Bremer 2009). Porém, de acordo com a morfologia vegetal, verificou-se que flores pistiladas e frutos solitários são característicos de *Duroia* (Delprete 2010).



Figura 2 - Mapa de calor representativo da distribuição geográfica de espécies pertencentes ao gênero *Duroia*. Fonte: Tropicos (2022).

Dentre as 14 espécies que apresentam informações disponíveis sobre seus respectivos estados de conservação, duas estão caracterizadas como dados insuficientes (*D. hirsutissima* e *D. palustris*), oito como menos preocupante (*D. fusifera*, *D. genipoides*, *D. eriopila*, *D. velutina*, *D. prancei*, *D. micrantha*, *D. saccifera* e *D. sancti-cipriani*), duas como quase ameaçadas (*D. soejartoi* e *D. gransabanensis*) e duas como vulneráveis (*D. valesca* e *D. strigosa*) (IUCN 2022).

Na Amazônia brasileira foram constatadas 22 espécies pertencentes ao gênero (Nascimento, 2013). Sendo que na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada na cidade de Manaus, AM, Brasil e considerada uma das reservas mais estudadas na Amazônia, foram encontradas e identificadas quatro espécies pertencentes a este gênero: *D. gransabanensis* Steyerm, *D. saccifera* Hook. F., *D. longiflora* Ducke e *D. macrophylla* Huber (Taylor et al. 2007).

### 1.3 *Duroia macrophylla*

*Duroia macrophylla* Huber (Figura 3) é uma árvore terrícola, endêmica da região amazônica, ocorre no Peru, Venezuela e Brasil. De acordo com o *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) sua distribuição ocorre nos seguintes Estados brasileiros: Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Mato Grosso (Figura 4), todavia não estão disponíveis informações em relação ao seu estado de conservação. É conhecida popularmente como cabeça-de-urubu, apuruí ou puruí-grande-da-mata e tem como sinonímia a espécie *Coupou brasiliensis* Wernham (Zappi 2015).

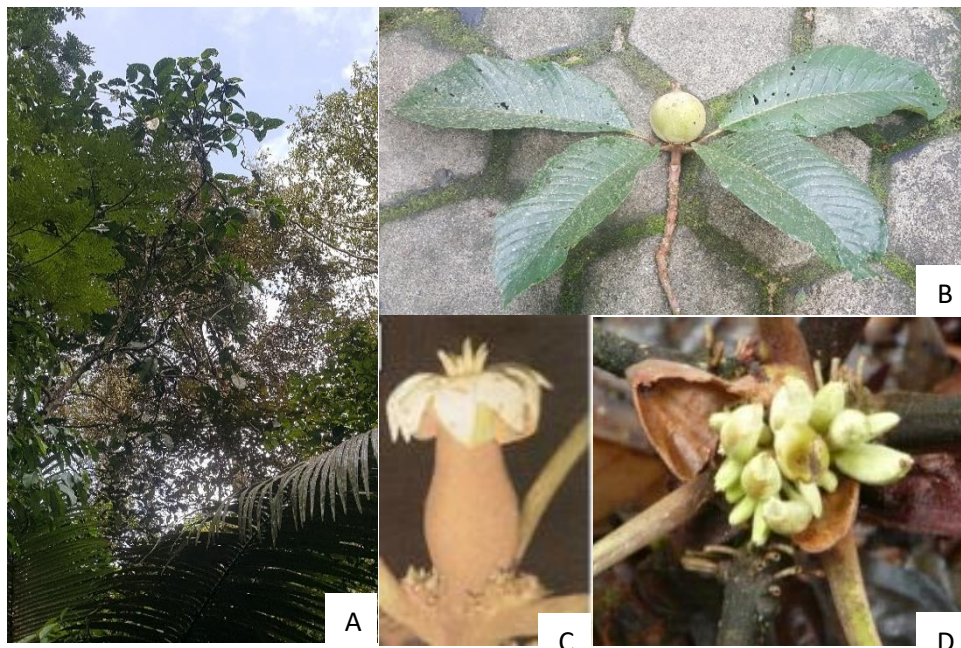


Figura 3 - *Duroia macrophylla*. A- Aspecto geral da árvore; B- Detalhe das folhas com o fruto; C- Flor; D- Detalhe da estípula. Fonte: Silva (2019) A, B; Ribeiro et al (1999) C; Martins (2014)D.



Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). Fonte: GBIF (2021).

É uma espécie frutífera comestível, não cultivada, encontrada geralmente em *habitat* de solo argiloso, úmido e margens de igarapé, mas também pode ser encontrada em *habitats* diversos como em moitas de tucumã e cupiúba (Nascimento 2013). O período de floração acontece em novembro e dezembro e frutifica de janeiro a junho (Campos e Brito 1999).

Entretanto, Nascimento (2013) encontrou espécimes florescendo de setembro a dezembro e frutificando em outubro e dezembro.

*D. macrophylla* é descrita morfológicamente como uma árvore de 15 a 20 metros de altura, 12 a 25 centímetros de diâmetro, com tronco circular, base às vezes acanalada e digitada. Ritidoma marrom a marrom avermelhado, levemente fissurado e escamoso. Folhas ternadas e longamente pecioladas. Flores estaminadas pediceladas, pistiladas não vistas, bagas solitárias, sésseis, subglobosas ou elipsóides, ferrugíneo-tomentosas. Sementes orbiculares, comprimidas, pubescentes (Taylor et al. 2007) (Figura 5).

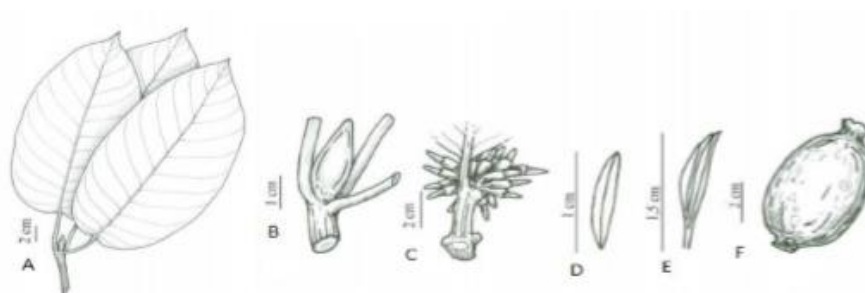


Figura 5 - Características morfológicas de *Duroia macrophylla*. A - Ramo com folha ternada e estípula; B - Estípula trisulcada; C - Inflorescência; D - Antera; E - Estilete bífido; F - Fruto com cálice persistente. Fonte: Nascimento (2013).

Estudos químicos e biológicos de *D. macrophylla* mostram que a espécie produz substâncias que apresentam atividades biológicas. Dentre os estudos realizados neste âmbito, destaca-se: o que revela a atividade antiangiogênica (Carvalho et al. 2021), toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, atividade antibacteriana frente a *Nocardia brasiliensis* e *Serratia marcescens* (Martins 2014), atividade contra o causador da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (Martins et al. 2013, 2014a, Reis et al. 2016), atividade antioxidante e inseticida (Martins et al. 2014b). Além dos trabalhos científicos, essa espécie apresentou atividades significativas que geraram o depósito de duas patentes: uma referente a um alcaloide indólico inédito com atividade antitumoral (Nunez e Vasconcelos 2012) e a outra, já concedida, de oito alcaloides indólicos com atividade antituberculose (Nunez et al. 2014).

O estudo proteômico dos calos, folhas e galhos de *D. macrophylla*, para o conhecimento das proteínas relacionadas à produção dos metabólitos secundários, descreveu 3.024 proteínas, entre as quais 364 são relacionadas a defesa e resposta ao estresse e 51 ao metabolismo secundário (Coelho 2018).

O acesso a informações genéticas de espécies, sobretudo as que apresentam importante potencial biotecnológico, como no caso de *D. macrophylla*, faz-se necessário, pois são

primordiais nos processos que envolvem melhorias de estratégias de conservação e manejo para a espécie, sendo este o primeiro estudo desta natureza a ser realizado dentro do gênero *Duroia*.

#### **1.4 Marcadores Moleculares**

Marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). São utilizados para analisar variações genótípicas dentro da sequência nucleotídica, incluindo inserções, deleções, translocações, duplicações e mutações pontuais (Ferreira e Grattapaglia 1998). Podem ser encontrados em muitas partes do genoma, são estáveis e detectáveis em todos os tecidos e em qualquer estágio do desenvolvimento, são geralmente neutros, não sendo afetados pelo ambiente e alguns são codominantes, o que permite a distinção entre indivíduos homo e heterozigotos (Mondini et al. 2009).

Nas espécies vegetais, o DNA está contido em três compartimentos distintos, na mitocôndria, no cloroplasto e no núcleo celular, com características genômicas distintas. O genoma mitocondrial possui herança uniparental e taxa de evolução mais lenta entre os três genomas, e por ser o menos variável, apresenta baixa efetividade em estudos sobre a variabilidade genética de populações vegetais (Braukmann et al. 2017).

Para a seleção dos marcadores moleculares a serem utilizados em diversos âmbitos da biologia molecular, além das taxas de polimorfismos, também devem ser levados em consideração a reprodutibilidade, praticidade e custo (Mondini et al. 2009).

##### **1.4.1 Marcadores Moleculares Cloroplastidiais**

O genoma cloroplastidial é uma molécula de DNA circular que possui herança uniparental (Chung et al. 2019). Geralmente apresenta tamanho entre 120.000 e 170.000 pares de bases (pb), com elevado grau de conservação no tamanho, estrutura, conteúdo gênico e ordem linear dos genes em plantas terrestres (Downie e Palmer 1992). Este genoma contém duas repetições invertidas (IR's) que são imagens espelhadas uma da outra em termo de complemento gênico. Essas repetições são separadas uma da outra por uma grande (*large single-copy*, LSC) e uma pequena região de cópia única (*small single-copy*, SSC) (Chaney et al. 2016) (Figura 6).

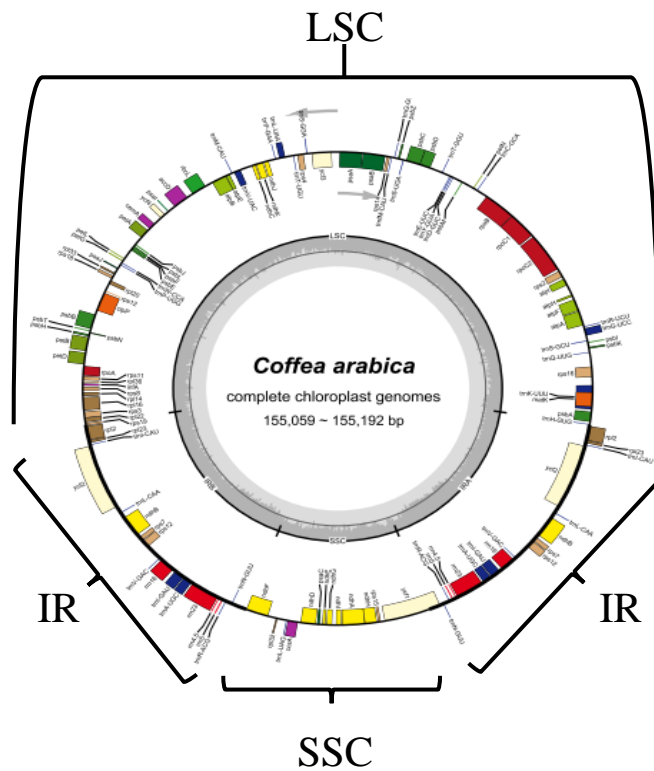


Figura 6 - Organização gênica do genoma do cloroplasto de *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) com destaque das repetições invertidas (IR's), da região grande (LSC) e da região pequena de cópia única (SSC). Genes pertencentes a diferentes grupos funcionais são classificados com diferentes cores e os que estão representados no interior do círculo são transcritos em sentido horário e os que estão no exterior no círculo são transcritos no sentido anti-horário (modificado de Mekbib et al. 2020).

Em *Coffea arabica* (Rubiaceae) a região LSC é composta de 22 RNA's transportadores (RNAt) e 61 genes codificadores de proteínas e a região SSC de um RNAt e 12 genes codificadores de proteínas. E, nas IR's foram encontrados sete genes de RNAt, oito codificadores de proteínas e quatro de RNA ribossômico (RNAr) (Mekbib et al. 2020).

O DNA cloroplastidial (DNACp) apresenta genes codificantes de proteínas, íntrons e espaçadores intergênicos, sendo que os dois últimos são referentes a regiões não codificadoras. Essas regiões (não codificadoras) são utilizadas em estudos genéticos nos diferentes níveis taxonômicos, geralmente em níveis de gênero e espécie (Taberlet et al. 1991, Silva et al. 2016, Lange et al. 2018). Os marcadores codificadores do genoma cloroplastidial também são utilizados em diversos âmbitos na biologia molecular (Mishra et al. 2016, Mezzasalma et al. 2017, Vasconcelos et al. 2021).

#### 1.4.2 Marcadores Moleculares Microsatélites

Os microsatélites, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR), são sequências nucleotídicas de tamanho curto, contendo de um a seis pares de bases, repetidas *em tandem*, ou seja, uma após a outra. São encontrados em alta frequência no genoma nuclear da

maioria dos organismos (Avisé 2004). Podem ser encontrados em regiões codificadoras ou não e são geralmente muito polimórficos devido ao alto nível de variação no número de repetições (Atherly et al. 1999). E, pode ser empregado em genética de populações de plantas, apresentando uma grande contribuição na melhoria das estimativas de parâmetros genéticos, especialmente em populações com diversidade baixa ou não detectada por outros marcadores (Paetkau et al. 1995).

As altas taxas de polimorfismo podem surgir através de um mecanismo específico chamado deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase (Strand et al. 1993). Outro motivo pela qual a taxa de polimorfismo é alta nos microssatélites é devido ao *crossing-over* desigual, causado pelo pareamento errôneo destas sequências durante o quiasma. Quando este evento ocorre, pode ocorrer perda ou ganho de um grande número de repetições. Isto acontece porque quando há uma região repetitiva de microssatélite, pode ser formado um grampo durante a sinapse, o que faz com que partes de diferentes comprimentos de cada cromossomo sejam trocados, resultando em um cromossomo recebendo um fragmento maior, e o homólogo recebendo um menor número de repetições (Oliveira et al. 2006).

Os marcadores moleculares microssatélites estão entre os mais utilizados em estudos de análise populacional, devido às sequências de DNA que flanqueiam as regiões repetitivas serem geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores (“*primers*”) específicos para amplificação de fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Caixeta et al. 2006).

A classificação dos microssatélites está relacionada ao número de nucleotídeos encontrados em cada repetição (motivo de repetição), como: mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (Queller e Goodnight 1989). E, quanto à natureza de repetição como perfeitos, quando a sequência nucleotídica do microssatélite não é interrompida por um nucleotídeo que não pertença ao motivo de repetição, imperfeitos, quando existe um nucleotídeo que não corresponde ao motivo de repetição na sequência, compostos, quando a sequência nucleotídica é formada por dois ou mais motivos de repetição e interrompidos, quando ocorre a inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na sequência nucleotídica do microssatélite (Weber 1990).

Foi detectada a presença das repetições ricas em (AC) $n$  e (AG) $n$  em plantas (Condit e Hubbell 1991). Foi verificada a presença desse marcador em 34 espécies vegetais com uma frequência de 1 a cada 50 mil pares de bases, estando em menor frequência de que nos

vertebrados, mas em maior frequência de que nos invertebrados e fungos, além disso, verificou que o dinucleotídeo AT foi o elemento repetido mais comum (Morgante e Olivieri, 1993).

Estes marcadores podem fornecer locos polimórficos a ser utilizados no estudo da diversidade e estrutura genética, sistema reprodutivo e fluxo gênico de determinada espécie. Além de auxiliar nos estudos de ecologia populacional e genética da conservação. Por serem de natureza espécie-específico, são geralmente desenvolvidos para uma determinada espécie alvo ou podem se otimizados para serem utilizados em espécies geneticamente próximas (locos heterólogos).

## 1.5 Variabilidade Genética

As populações naturais apresentam alta variabilidade genética intrapopulacional, que é introduzida por eventos evolutivos como mutação e migração, porém, pode ser perdida por eventos de deriva genética e seleção natural (Morand et al. 2002). A variabilidade genética também pode ser reduzida quando espécies apresentam um sistema de reprodução preferencialmente endogâmico.

Espécies de plantas com uma ampla distribuição geográfica tendem a ter maior variabilidade genética do que espécies com distribuição restrita. Devido aos indivíduos que ocupam nichos ecológicos diferentes serem forçados a adaptar-se a diferentes condições ambientais, e com o tempo, essa adaptação pode refletir na diferenciação genética entre as populações. E, também, devido a essas populações maiores sofrerem em menor grau os efeitos da deriva genética (Hamrick e Godt 1996).

Níveis altos de heterozigosidade em uma população permitem maior chance de sobrevivência, resistência a doenças, taxa de crescimento e sucesso reprodutivo aos indivíduos (Frankham et al., 2002).

O conhecimento sobre o nível de polimorfismo que diferentes marcadores moleculares apresentam em *D. macrophylla* é importante para que possam ser empregados de maneira eficiente em estudos moleculares que incluem a investigação sobre a variabilidade, estruturação genética, fluxo gênico e biologia reprodutiva. E para isso, é fundamental que seja disponibilizado um protocolo de extração de DNA otimizado para a espécie, visto que sua composição química inviabiliza a obtenção do material genético de boa qualidade.



## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar regiões genômicas a partir de marcadores cloroplastidiais e nucleares (ITS e microssatélites) de *Duroia macrophylla*, para que possam ser utilizados em estudos populacionais da espécie.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Otimizar um protocolo para extração de DNA genômico para *D. macrophylla* (Capítulo I);
- Avaliar o nível de polimorfismo de marcadores moleculares cloroplastidiais e nuclear (ITS), baseados em sequência de DNA, para estudos genético populacional da *D. macrophylla* (Capítulo II).
- Construir e caracterizar uma biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites para *D. macrophylla* (Capítulo III);
- Isolar e caracterizar loci microssatélites de *D. macrophylla* em uma população natural (Capítulo III).

## Capítulo I

---

Silva, J.N.; Ramos, S.L.F.; Nunez, C.V.; Batista, J.S. 2022. Otimização do protocolo de extração de DNA do apuruí (*Duroia macrophylla* Huber): uma frutífera amazônica de importância biotecnológica. Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*.

## Resumo

Para o acesso a informações genéticas de determinada espécie é imprescindível que o DNA apresente boa qualidade e levando em consideração que a presença de metabólitos secundários no apurú (*Duroia macrophylla*) dificulta a extração do DNA genômico, torna-se necessária a disponibilização de um protocolo de extração adequado para a espécie. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo de extração de DNA para *D. macrophylla*. Com isso, foram realizadas oito alterações (tratamentos) em triplicata no protocolo de Doyle e Doyle (1990) que incluem alterações no modelo de fragmentação do material vegetal (folhas), tempo e temperatura de digestão e de precipitação. As amostras foram quantificadas por fluorometria e espectrofotometria, foram medidas as absorbâncias que indicam pureza do DNA ( $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$ ). As amostras foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose e validadas por amplificação por PCR com três marcadores moleculares diferentes. Na análise estatística foram realizados os testes F e de *Scott Knott*. O tratamento 6 apresentou maior eficiência, pois apresentou maior quantidade de DNA e diferença significativa em relação aos demais tratamentos. As alterações que resultaram na eficiência do tratamento estão relacionadas a fragmentação com disruptor automático e ao tempo de digestão de material biológico de 60 °C e temperatura de precipitação do DNA que foi de -20 °C *overnight*. Os tratamentos 4, 7 e 8 apresentaram pureza em relação a proteínas. Todos os tratamentos estavam suscetíveis à amplificação com os diferentes marcadores utilizados, porém apresentaram diferentes taxas de rendimento. Além disso, o DNA diluído de 1:15 apresentou maior número de ampliações devido a diluição resultar na redução da concentração de possíveis inibidores.

Palavras-chave: metabólitos secundários, inibidores de PCR, isolamento de DNA, pureza de DNA.

## 1. Introdução

A família Rubiaceae destaca-se por possuir espécies que produzem metabólitos secundários que apresentam potencial farmacológico (Heitzman et al. 2005). A espécie *Duroia macrophylla* Huber é uma dessas espécies e produz substâncias da classe química dos alcaloides e triterpenos que apresentam atividades biológicas (Nunez et al. 2009, Martins 2014).

Diferentes vertentes de pesquisa podem ser realizadas com essa espécie de grande relevância científica, com intuito de promover sua valorização, e uma destas é o estudo genético. Contudo, no processo de obtenção de material genômico, a presença dos metabólitos secundários pode inviabilizar ou dificultar o isolamento de DNA de boa qualidade (Oliveira et al. 2017). Estas substâncias, incluindo os terpenos são liberados durante a lise celular e se aderem irreversivelmente ao DNA inibindo a digestão com endonucleases de restrição e/ou a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Couch e Fritz 1990).

Contudo, considera-se primordial que o isolamento de DNA apresente pureza e concentração adequadas para o desenvolvimento de metodologias moleculares, a fim de gerar informações genéticas. Para isso, diversos protocolos de extração de DNA genômico estão disponíveis na literatura (Dellaporta et al. 1983, Couch e Fritz 1990, Doyle e Doyle 1990, Lodhi et al. 1994, Weising et al. 2005), porém, podem não ser eficientes para todas as espécies, sendo necessárias adaptações e modificações em tais protocolos (Aras et al. 2003).

O método que utiliza o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), cuja função é romper a membrana da célula e deixar exposto o material genético, é amplamente utilizado para extração de DNA de folhas, sementes, grãos e amostras processadas de alimentos (ISO 2005). O tampão de extração de DNA, também conhecido como tampão de lise, geralmente inclui o CTAB propriamente dito, NaCl (Cloreto de sódio), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e Tris-HCl (Tris hidrocloreto). Apesar de ser bem estabelecido, existem várias versões ou modificações nesse protocolo (Demeke e Jenkins 2010).

Os métodos mais antigos para isolamento de DNA de plantas requerem grandes quantidades de tecido vegetal devido ao baixo rendimento, mas isso é uma desvantagem quando são utilizados vários indivíduos pequenos. Atualmente, encontram-se protocolos disponíveis que são menos custosos e possibilitam altos rendimentos de DNA através de pequenas quantidades de tecido, um desses é o de Doyle e Doyle 1990.

Um protocolo de extração de DNA que funciona bem com um grupo de plantas pode não funcionar com outros, devido à diversidade de particularidades destes organismos e seus compostos secundários. Um exemplo de modificação é a adição de polivinilpirrolidona (PVP)

no tampão de lise para extração de DNA de plantas com altas concentrações de compostos fenólicos (Doyle e Doyle 1990), tais compostos interferem na digestão do DNA por causa da restrição das endonucleases (Couch e Fritz 1990) e já se mostraram purificados juntamente com o DNA (Katterman e Shattuck 1983).

A quantificação de DNA após a extração é importante para que este material seja utilizado de forma adequada em técnicas moleculares posteriores, como por exemplo em ampliações por PCR. Nesta medição são utilizadas metodologias baseadas na espectrofotometria, fluorometria, quimioluminescência e/ou eletroforese em gel de agarose (Demeke e Jenkins 2010). Na espectrofotometria, as concentrações de soluções de ácidos nucleicos são quantificadas medindo a absorbância a 260 nanômetros (nm) ( $A_{260}$ ) (Cavaluzzi e Borer 2004). Por fluorometria, a concentração das amostras é estimada por interpolação, na qual o valor é determinado a partir do conhecimento dos valores extremos, que nesse caso, são os valores de fluorescência dos padrões de concentração conhecida (Demeke e Jenkins 2010).

A pureza do DNA é obtida a partir da razão de absorbância em 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) que representa a quantidade de DNA em relação a proteínas e em 260 e 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) que representa a quantidade de DNA em relação a outros contaminantes, como alguns reagentes utilizados durante a extração. Os valores para  $A_{260}/A_{280}$  devem se situar entre 1,8 e 2,0 para representar um DNA puro, no entanto, se o valor obtido for menor pode indicar principalmente a presença de proteína e se for maior a presença de fenol (Romano e Brasileiro 1999). Para  $A_{260}/A_{230}$ , os valores devem se encontrar entre 2,0 e 2,2, valores inferiores podem indicar a presença de outros contaminantes, tais como os reagentes utilizados durante a extração de DNA (Ex: CTAB, fenol, clorofórmio e álcool isoamílico).

A eletroforese em gel de agarose é comumente utilizada para avaliar a qualidade do DNA por meio da identificação visual de degradação e contaminação por polissacarídeos, além da estimativa da concentração do DNA em uma solução comparando visualmente à intensidade de bandas de concentração conhecida (como o DNA do *fago lambda*) (Demeke e Jenkins 2010). Desde que o DNA tenha uma relação carga-massa consistente, o principal fator que influencia sua migração através de uma matriz de gel é o tamanho (Sambrook e Russell 2001).

A amplificação por PCR de fragmentos específicos de DNA e em condições adequadas possibilita a certificação da qualidade do DNA. Nesta, são utilizados alguns marcadores moleculares que oferecem possibilidades de alcance a diferentes respostas biológicas. Dentre os marcadores utilizados em estudos genéticos, destacam-se os cloroplastidiais: íntron da proteína ribossomal s16 (*rps16* íntron) e a maturase k (*matK*). E o marcador oriundo do núcleo

da célula, o espaçador transcrito interno, do inglês *internal transcribed spacer* (ITS) (Luz 2019). Estes genes apresentam desempenho relativamente bom em ampliações e sequenciamentos nucleotídicos nas angiospermas (Li et al. 2011).

O *rps16* é um gene que codifica a proteína ribossomal S16, o *rps16* íntron pertence à classe B1 dos íntrons do grupo II (Michel et al. 1989) e separa os exons desse gene. O gene cloroplastidial *matK*, anteriormente conhecido como *orfK*, é codificador da proteína maturase localizado no íntron de *trnK*, encontrado na grande região de cópia única do genoma do cloroplasto (Stanford et al. 2000). O ITS, proveniente do DNA nuclear, está localizado no gene de RNAr eucarióticos entre o 18S e regiões codificadoras de RNAr 5,8S (ITS1), e entre as regiões codificadoras de RNAr 5,8S e 28S (ITS2).

O acesso a informações genéticas de organismos, como variabilidade e estruturação genética, fluxo gênico, biologia reprodutiva, entre outras, é fundamental principalmente de espécies que apresentam potencial biotecnológico e além disso, requer que o DNA extraído apresente boa qualidade. Levando em consideração que a presença de metabólitos secundários no apurú (*Duroia macrophylla*) dificulta a extração do DNA genômico, torna-se necessária a disponibilização de um protocolo de extração de DNA adequado e otimizado para a espécie. Com isso, o objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo de extração de DNA para *D. macrophylla*.

## 2. Material e métodos

Na Reserva Florestal Adolpho Ducke, que está localizada na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil, foi identificado um espécime de *D. macrophylla* do qual foram coletadas folhas (SISGEN AE23A4A). A exsicata foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) com o número: 291916. As folhas foram armazenadas em saco plástico tipo *zip lock* contendo sílica gel a -20 °C no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LTBM- INPA) até o início dos tratamentos para extração do DNA.

O método de extração de DNA genômico do material vegetal do indivíduo de *D. macrophylla* foi baseado no protocolo de Doyle e Doyle (1990), pois este apresentou bons resultados em outras espécies vegetais que apresentam elevadas taxas de metabólitos secundários em sua composição (Oliveira et al. 2017). A partir deste foram realizadas oito modificações nas etapas de fragmentação, digestão e precipitação, a fim de verificar qual das

combinações resultariam na extração de DNA com concentração, integridade e qualidade adequadas para utilização em etapas posteriores de amplificação (Tabela 1).

Tabela 1 - Tratamentos referente às oito modificações no protocolo de extração de DNA genômico (Doyle e Doyle, 1990) nas etapas de fragmentação e digestão do material biológico e precipitação do DNA, baseadas em um protocolo já estabelecido e comumente utilizado em laboratório.

Tratamento	Fragmentação	Digestão	Precipitação
T1	Almofariz e pistilo	60 °C - 30 minutos	-80 °C - 60 minutos
T2			-20 °C - <i>overnight</i>
T3		37 °C - <i>overnight</i>	-80 °C - 60 minutos
T4			-20 °C - <i>overnight</i>
T5	Macerador automático*	60 °C - 30 minutos	-80 °C - 60 minutos
T6			-20 °C - <i>overnight</i>
T7		37 °C - <i>overnight</i>	-80 °C - 60 minutos
T8			-20 °C - <i>overnight</i>

\* Modelo: *BeadBeater* (Biospec Products)

Para o processo de extração do DNA o material vegetal foi retirado do armazenamento a -20 °C e colocadas a temperatura ambiente do laboratório (25°C). Estas folhas foram lavadas com água destilada, secas com papel toalha, recortadas em pequenos pedaços e pesadas (cerca de 100 mg para cada amostra). Após isso, foram fragmentadas, dependendo do tratamento, com auxílio de almofariz e pistilo ou disruptor automático *BeadBeater* (Biospec Products) com o auxílio de 2 esferas (*beads*) de 5 mm. O produto fragmentado foi transferido para um microtubo de 2 mL, onde foram adicionados 800 µL CTAB 2% e 2 µL de β-mercaptoetanol.

Posteriormente foi realizada a etapa de digestão do material biológico, na qual os tubos contendo as amostras foram incubados a uma temperatura de 60 °C por 30 minutos ou 37 °C *overnight*, em uma incubadora com agitação (700 rpm) *Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific). Finalizada a etapa de digestão, foram adicionados 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA) na proporção 24:1, centrifugou-se em velocidade de 2204 rcf por 12 minutos, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e a fase orgânica foi descartada. Esta etapa foi realizada por duas vezes.

Na fase aquosa obtidas de cada umas das amostras, foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado (-20 °C, aproximadamente), para permitir a precipitação do DNA com uma prévia agitação do microtubo de forma cuidadosa para permitir a mistura da substância com o DNA. Sendo as condições de incubação a -20 °C *overnight* ou a -80 °C por 60 minutos. Após a precipitação o material foi centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

Na sequência, após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e mantido o DNA precipitado (*pellet*) posteriormente lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado em seguida

por 2 minutos e retirado o sobrenadante novamente. Essa etapa foi repetida por mais uma vez. Foi realizado o mesmo procedimento com etanol 100%, em seguida, a amostra foi colocada em estufa a 37 °C por 30 minutos. O *pellet* foi ressuspendido com 50 µL de água ultrapura, incubado a temperatura ambiente por cerca de 12 horas e então armazenado a 4 °C para a completa eluição.

As concentrações das amostras de DNA extraídas foram quantificadas pelas técnicas de fluorometria e espectrofotometria. Na fluorometria foi utilizado o kit de reagentes ds DNA BR (*Broad range*) que permite quantificar entre 2 e 1000 ng de DNA, específico do equipamento Qubit® 3.0 (ThermoFisher). Na espectrofotometria foi utilizado o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para análise do nível de pureza também foi utilizado este equipamento para obtenção da razão das absorbâncias  $A_{260}/A_{230}$  (representa a quantidade de DNA em relação a contaminantes) de  $A_{260}/A_{280}$  (quantidade de DNA em relação a proteínas). Ambas as análises foram realizadas seguindo as recomendações dos fabricantes.

Além dos resultados por fluorometria e espectrofotometria, foi verificada a integridade do DNA e o rendimento da extração pela técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8% com a utilização do Diamond™ *Nucleic Acid Dye* (Promega), na qual foram observadas quais amostras (repetições de cada tratamento) apresentaram bandas. A leitura das bandas foram fotodocumentadas em Transilluminator (AlphaImager MINI). O comparador utilizado com o DNA extraído no gel foi o DNA do *fago lambda* por possuir concentração e integridade conhecida a fim de possibilitar a estimativa por comparação.

Para verificar a eficiência dos oito tratamentos de extração de DNA, foram realizadas amplificações por PCRs utilizando os genes cloroplastidiais *rps16* íntron e *matK*, e mais um fragmento nuclear ITS (espaçador interno transcrito). Essas amplificações foram realizadas com o DNA não diluído e em diferentes diluições do DNA: 1:5, 1:10 e 1:15, de forma que a concentração de DNA variasse em torno de 2,14 e 255,7 ng/µL (de acordo com a quantificação por fluorometria).

Cada PCR foi composta por um volume final de cada PCR de 15 µL, composta por 7,5 µL do tampão 2x (*GoTaq® Green Master Mix* - Promega®), 1 µL de *primer forward* e 1 µL de *reverse* (5 µM cada), 0,75 µL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) 5 mg/mL, 3,75 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA extraído.

As reações foram realizadas no termociclador Veriti® *Thermal Cycler* (ThermoFisher) seguindo as recomendações da literatura disponível (Tabela 2). A amplificação destes



fragmentos foi analisada em eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o 1kb plus a fim de verificar o tamanho (em pares de bases- pb) do fragmento amplificado.

Tabela 2 - Condições para amplificação de regiões genômicas de *Duroia macrophylla*.

Marcador molecular	Genoma	primers	Perfil de amplificação	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>matK</i>	Cloroplastidial	matK-400F	95 °C-1' [35 ciclos: 95 °C-1', 54 °C-1', 72 °C-2'] 72 °C-10'	790	Cameron et al. (2001)
		trnK-2R			
<i>rps16</i> íntron		rps16-F	95 °C-1'30'' [35 ciclos: 95 °C-50'', 60 °C-50'', 72 °C-1'50''] 72 °C-1'	760	Andersson e Rova (1999)
		rps16-R			
ITS	Nuclear	ITS-5 <sup>a</sup>	94°C -2' [35 ciclos: 94°C- 1', 54°C-1', 72°C- 2'] 72°C- 5'	645	Stanford et al. (2000)
		ITS-4			White et al. (1990)

Assim, o experimento de extração de DNA foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos distribuídos em arranjo fatorial de 2 x 2 x 2 nas diferentes etapas de extração do DNA utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1990), sendo estas: 1) Duas formas de fragmentação, com almofariz e pistilo e com plataforma automatizada; 2) Dois tempos de digestão, um a 60 °C por 30 minutos e outro a 37 °C por 12 horas (*overnight*); 3) Dois tempos de precipitação, a -80 °C por 60 minutos e a -20 °C pelo período de 12 horas (*overnight*) (Tabela 1), cada tratamento apresentou 3 repetições, o que representa um total de 24 amostras. Para normalização, os dados foram transformados em função logarítmica ( $\log_{10}$ ).

O teste F foi realizado e para aquelas variáveis em que foi significativo, foi utilizado o teste de *Scott Knott* ao nível de 5% de probabilidade, para avaliar a diferença entre as médias dos tratamentos.

Estas análises foram realizadas na plataforma R (R Core Team, 2022) utilizando as funções *aov*, *bartlett.test*, *shapiro.test*, *sd*, *var*, *summary* da própria plataforma, as funções *LTukey* e *LScottKnott* do pacote *Laercio* (Da Silva 2010) e a função *fat3.dic* do pacote *ExpDes.pt* (Ferreira et al. 2013).

### 3. Resultados

Foram observadas diferenças nas médias das concentrações e do grau de pureza das amostras de DNA extraídas a partir de oito tratamentos. A média das concentrações obtidas por

espectrofotometria variou de 491,6 (tratamento 1) a 2323,1 ng/ $\mu$ L (tratamento 6), e por fluorometria de 32,1 (tratamento 2) a 255,7 ng/ $\mu$ L (tratamento 6) (Tabela 3).

O tratamento 6 possui como particularidades a fragmentação em disruptor automático, digestão do material biológico em uma temperatura de 60 °C por 30 minutos e precipitação a uma temperatura de -20 °C *overnight*. Enquanto que no tratamento 1, a fragmentação foi realizada com auxílio de almofariz e pistilo, a precipitação a -80 °C por 1 hora e a digestão equivalente à do tratamento 6. O tratamento 2 diferiu do 1 somente na precipitação, que foi -20 °C *overnight*. Com relação aos valores correspondentes à pureza, as médias das absorvâncias de  $A_{260}/A_{230}$  variaram entre 0,7 e 1,4, enquanto que as de  $A_{260}/A_{280}$  variaram entre 1,5 e 2,2.

Tabela 3 - Média das concentrações das amostras de DNA de *Duroia macrophylla* extraídos a partir de oito tratamentos realizados em triplicata e das razões das absorvâncias  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$  com os respectivos desvios padrões.

Tratamentos	Amostras (triplicata)	Média de concentração do DNA (ng/ $\mu$ L) e desvio padrão Espectrofotometria*	Média de concentração do DNA (ng/ $\mu$ L) e desvio padrão Fluorometria**	Média da absorvância $A_{260}/A_{280}$	Média da absorvância $A_{260}/A_{230}$
T1	1.1	491,6 $\pm$ 207,7	37,0 $\pm$ 3,7	2,2 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,4
	1.2				
	1.3				
T2	2.1	691,6 $\pm$ 96,3	32,1 $\pm$ 12,1	1,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
	2.2				
	2.3				
T3	3.1	654,0 $\pm$ 139,4	41,8 $\pm$ 4,5	1,5 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2
	3.2				
	3.3				
T4	4.1	576,4 $\pm$ 71,7	36,7 $\pm$ 7,8	1,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2
	4.2				
	4.3				
T5	5.1	1010,8 $\pm$ 144,7	180,3 $\pm$ 159,4	1,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2
	5.2				
	5.3				
T6	6.1	2323,1 $\pm$ 1062,3	255,7 $\pm$ 100,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,5
	6.2				
	6.3				
T7	7.1	832,7 $\pm$ 82,6	199,0 $\pm$ 63,6	1,9 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,6
	7.2				
	7.3				
T8	8.1	643,4 $\pm$ 557,3	176,6 $\pm$ 149,7	1,7 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2
	8.2				
	8.3				

\* NanoDrop; \*\* Qubit.

As análises de variância mostram significância de forma independente para as variáveis Esp (espectrofotometria), Flu (fluorometria), Ab1 (absorbância  $A_{260}/A_{280}$ ) e Ab2 (absorbância  $A_{260}/A_{230}$ ) (Tabela 4). Foram detectadas diferenças significativas (representadas pelos asteriscos) entre os tratamentos, entre as técnicas de fragmentação (maceração) (TMA), entre o tempo e temperatura de precipitação (TTP), entre a TMA combinada com o tempo e temperatura de digestão (TTD) e entre o TTD combinado com o TTP. Enquanto por fluorometria, somente entre os tratamentos e entre as técnicas de maceração foram verificadas diferenças significativas.

Em relação ao nível de pureza em relação a proteínas (Ab1), os tratamentos, a combinação de TMA e TTD e a combinação de três etapas do protocolo (TMA:TTD:TTP) mostraram diferenças significativas. E, para a pureza em relação a outros contaminantes (Ab2) somente a combinação das três etapas mostrou significância.

Tabela 4 - Análises de variância para as variáveis Esp, Flu, Ab1 e Ab2, dos tratamentos de extração de DNA genômico para o apurú (*Duroia macrophylla*).

Tratamentos	GL	Quadrados Médios			
		Esp	Flu	Ab1	Ab2
Tratamentos	7	0,12***	25350*	0,20*	0,19
Técnica de maceração (TMA)	1	0,47***	165299***	0,01	0,01
Tempo e temperatura de digestão (TTD)	1	0,06	976	0	0,02
Tempo e temperatura de precipitação (TTP)	1	0,08*	691	0,26	0,28
TMA:TTD	1	0,11*	1831	0,57*	0,32
TMA:TTP	1	0,01	1482	0,09	0,20
TTD:TTP	1	0,11*	3597	0,12	0
TMA:TTD:TTP	1	0	3573	0,40*	0,54*
Residual	16	0,01	7768	0,07	0,11
CV (%)		4,06	73,51	16,2	37,33

Legenda: GL- Grau de liberdade; Esp- Espectrofotometria; Flu- Fluorometria; Ab1- absorbância  $A_{260}/A_{280}$ ; Ab2- absorbância  $A_{260}/A_{230}$ ; CV: Coeficiente de variação; (\*): 95% significativo; (\*\*\*): 99,9% significativo.

Com base na quantificação do DNA por espectrofotometria, a média das variáveis mostrou que o T6 é significativamente diferente dos demais tratamentos, e por fluorometria, os tratamentos de 5 a 8 apresentaram diferenças significativas em relação aos tratamentos de 1 a 4. Para Ab1, os tratamentos 1 e 7 mostraram diferenças em relação aos demais. Todavia, para o Ab2, nenhum dos tratamentos mostrou significância. Por espectrofotometria, foram verificadas diferenças estatísticas entre os dois modelos de TMA e de TTP. Por fluorometria, apenas o fator TMA apresentou diferença significativa. Enquanto que para as medidas de pureza, nenhum dos fatores mostrou significância (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias das variáveis Esp, Flu, Ab1 e Ab2, dos tratamentos de extração de DNA para apurú (*Duroia macrophylla*)

Tratamentos		Esp	Flu	Ab1	Ab2
T1		2,66 B	37,00 B	2,20 A	1,40 A
T2		2,83 B	32,10 B	1,46 B	0,66 A
T3		2,81 B	41,80 B	1,50 B	0,76 A
T4		2,76 B	36,73 B	1,56 B	0,70 A
T5		3,00 B	180,33 A	1,46 B	0,73 A
T6		3,33 A	255,66 A	1,50 B	0,96 A
T7		2,92 B	199,00 A	1,90 A	1,16 A
T8		2,93 B	176,56 A	1,70 B	0,86 A
Fator	Nível	Esp	Flu	Ab1	Ab2
TMA	1	2,76 B	36,90 B	1,68 A	0,93 A
TMA	2	3,04 A	202,98 A	1,64 A	0,88 A
TTD	1	2,95 A	126,27 A	1,66 A	0,94 A
TTD	2	2,85 A	113,52 A	1,65 A	0,87 A
TTP	1	2,84 B	114,53 A	1,76 A	1,01 A
TTP	2	2,96 A	125,26 A	1,55 A	0,80 A

Legenda: T1 a T8- Tratamentos 1 a 8; TMA- Técnica de maceração; TTD- Tempo e temperatura de digestão; TTP- Tempo e temperatura de precipitação; Esp- Espectrofotometria; Flu- Fluorimetria; Ab1- absorbância  $A_{260}/A_{280}$ ; Ab2- absorbância  $A_{260}/A_{230}$ .

\*As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de *Scott Knott* ao nível de 5%.

Observou-se que houve uma diferença de até 20 vezes entre as médias das concentrações obtidas por espectrofotometria (NanoDrop) e por fluorimetria (Qubit) (tratamento 2) (Figura 1). Além disso, em razão do alto desvio padrão da média das concentrações das amostras de um mesmo tratamento obtidas por espectrofotometria, foi verificado que a concentração obtida por fluorimetria esteve mais próxima ao que foi analisado em eletroforese em gel de agarose 0,8% e pode ser considerada mais fidedigna.

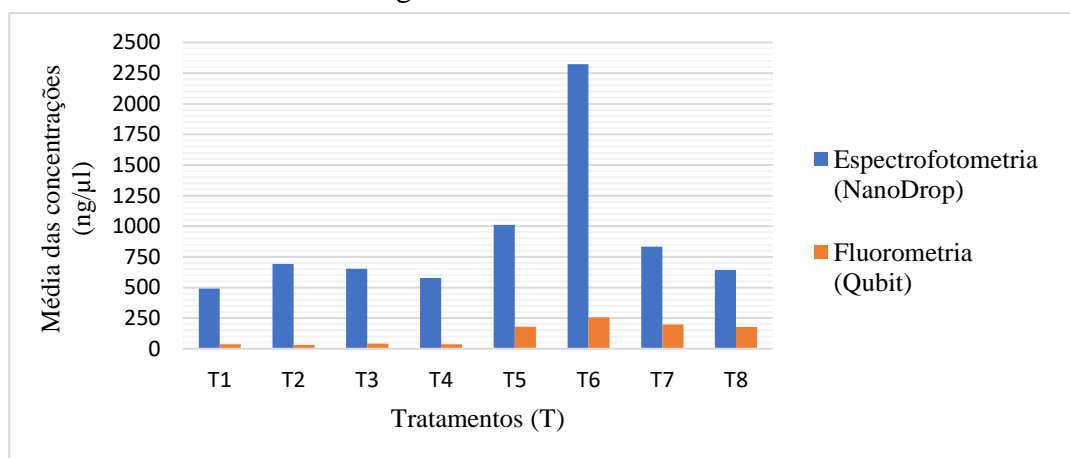


Figura 1 - Diferenças entre as médias de concentração de DNA genômico extraído com oito diferentes tipos de tratamento de um protocolo (T1 a T8), quantificada por espectrofotometria (NanoDrop) e fluorimetria (Qubit).

A análise qualitativa em eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 2) mostra que os oito tratamentos apresentam amostras com bandas nítidas. Somente a amostra dois proveniente do T8 não apresentou banda. Contudo, foram observados arrastos verticais principalmente nos tratamentos 5, 6, 7 e 8. O rendimento da extração de DNA foi de 91,7%, levando em consideração todas as amostras das triplicatas em todos os tratamentos.

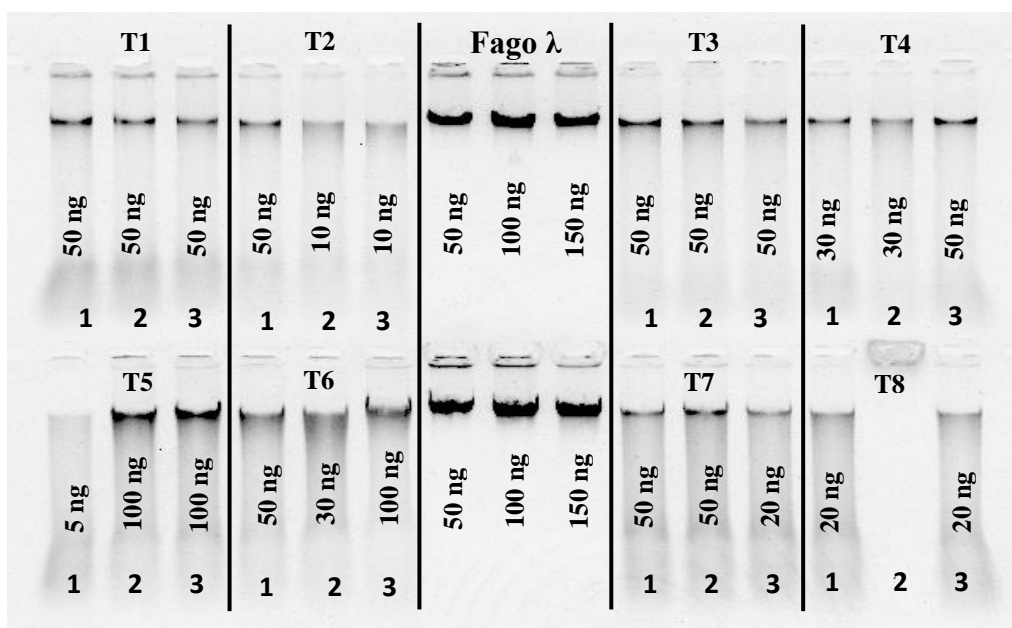


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de DNA de *Duroia macrophylla*, a partir de oito tratamentos diferentes (T1 a T8) realizados em triplicata e o DNA do fago lambda (Fago  $\lambda$ ) nas concentrações de 50, 100 e 150 ng, respectivamente.

A PCR realizada com as amostras de DNA oriundas dos oito tratamentos realizados em triplicata, em quatro concentrações (DNA não diluído, diluído 1:5, 1:10 e 1:15) para os dois marcadores moleculares (*rps16* íntron e *matK*) e duas concentrações (DNA não diluído e diluído 1:15) para o ITS, apresentou o maior número de amplificações com DNA diluído 1:15 (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantitativo de amplificações obtidas para os marcadores moleculares *rps16* íntron e *matK* em quatro diferentes concentrações de DNA (não diluído, diluído 1:5, 1:10 e 1:15), e para o ITS em duas concentrações de DNA (não diluído e 1:15) destacando as amplificações por concentração e por tratamento.

Marcador molecular	Tratamentos	N	1:5	1:10	1:15	
<i>rps16</i> íntron	T1	1	3	1	3	8 (66,6%)
	T2	0	1	1	2	4 (33,3%)
	T3	0	3	3	3	9 (75%)
	T4	0	3	3	3	9 (75%)
	T5	0	1	3	3	7 (58,3%)
	T6	0	0	2	3	5 (41,6%)
	T7	0	1	1	1	3 (25%)
	T8	0	0	0	0	0 (0%)

	T8	1 2 (8,3%)	0 12 (50%)	3 19 (79,1%)	3 21 (87,5%)	7 (58,3%)
<i>matK</i>	T1	3	3	3	3	12 (100%)
	T2	0	2	3	3	8 (66,6%)
	T3	1	3	3	3	10 (83,3%)
	T4	1	3	3	3	10 (83,3%)
	T5	0	2	3	3	8 (66,6%)
	T6	0	0	2	2	4 (33,3%)
	T7	2	3	1	1	7 (58,3%)
	T8	1	2	3	3	9 (75%)
			8 (33,3%)	18 (75%)	21 (87,5%)	21 (87,5%)
ITS	T1	0	-	-	1	1 (16,6%)
	T2	0	-	-	0	0
	T3	1	-	-	3	4 (66,6%)
	T4	0	-	-	2	2 (33,3%)
	T5	0	-	-	3	3 (50%)
	T6	0	-	-	3	3 (50%)
	T7	2	-	-	1	3 (50%)
	T8	1	-	-	3	4 (66,6%)
		4 (16,6%)	-	-	16 (66,6%)	

Legenda: (-): não foi realizado o teste; N: Não diluído; 1:5: DNA diluído de 1 para 5; 1:10: DNA diluído de 1 para 10; 1:15: DNA diluído de 1 para 15.

O número de amplificações obtidas com o marcador *rps16* íntron na diluição de 1:15 foi maior (cerca de 10 vezes) de que com o DNA não diluído. As duas amostras que amplificaram com o DNA não diluído, apresentavam concentrações de 32,8 ng/μL (tratamento 1) e 3,6 ng/μL (tratamento 8). Para esse marcador, os tratamentos 3 e 4 apresentaram 75% de rendimento.

A quantidade de amplificações com o marcador *matK* não diferiram, considerando o DNA diluído de 1:10 e 1:15, nessas concentrações as amplificações funcionaram nas três amostras da triplicata de seis tratamentos, em duas amostras do tratamento 6 e em uma do tratamento 7. As amostras que amplificaram com o DNA não diluído apresentavam concentrações que variavam de 3,6 a 204 ng/μL. O tratamento 1 foi o mais rentável para esse marcador.

Considerando que as amplificações com o DNA não diluído e com o diluído de 1:15 foram as que apresentaram menor e maior rendimento, respectivamente, as amplificações com ITS foram realizadas nessas duas condições, a fim de verificar se este padrão se repetiria com um marcador nuclear. Diante disso, verificou-se que o DNA diluído de 1:15 amplificou quatro vezes mais de que com o DNA não diluído, obedecendo o padrão equivalente ao já observado com os outros dois marcadores cloroplastidiais. Em contrapartida, os tratamentos 3 e 8 foram os mais rentáveis utilizando o marcador nuclear.

#### 4. Discussão

No tratamento que apresentou maior concentração de DNA em ambos os quantificadores (T6), a etapa de digestão acontece em cerca de 30 minutos, enquanto que alguns outros permaneceram em *overnight*. Este resultado torna-se importante, visto que o uso de um protocolo rápido e eficiente é fundamental, principalmente em estudos que incluem grande quantidade de espécimes (Oliveira et al. 2017) e que precisam ser analisados em curto ou médio prazo. Infere-se que este tratamento possa ser o mais eficiente, já que mostrou diferenças significativas em relação aos demais tratamentos (Tabela 5).

Foram observados que os tratamentos de 5 a 8 apresentaram maiores concentrações em relação aos tratamentos de 1 a 4. Essa diferença foi corroborada e confirmada no teste estatístico, o qual indica que há diferença entre os dois modelos utilizados na maceração. Pode-se inferir que esta diferença seja ocasionada devido à fragmentação em disruptor automático aumentar a superfície de contato, possibilitando uma possível melhor atuação em fragmentos menores dos reagentes, inclusive do tampão de lise.

Em estudos que utilizam praticamente as mesmas metodologias de extração de DNA que foram utilizadas neste trabalho e baseando-se no protocolo de Doyle e Doyle (1990), foi observado que a concentração de amostras de DNA apresentaram variação. Enquanto Sahu et al (2012) obtiveram amostra de DNA de 13 espécies de planta com altos níveis de metabólitos secundários e polissacarídeos variou de 8 a 9,9 ng/ $\mu$ L. As concentrações de DNA obtidas em espécies de *Capsicum* variaram de 480 a 6000 ng/ $\mu$ L (Lima et al. 2020).

Em um estudo realizado com *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae), espécie que apresenta um alto teor de tanino, os autores verificaram uma concentração de 234 ng/ $\mu$ L e elevado grau de impureza utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1990). Todavia, após o aumento da concentração de CTAB e cloreto de sódio, adição de fenol no processo de desproteinização, redução do tempo e temperatura de incubação, aumento da concentração de PVP e  $\beta$ -mercaptoetanol, os autores constataram uma concentração de 399 ng/ $\mu$ L e os valores das absorvâncias dentro do intervalo que indica pureza do DNA, além disso, essas modificações ainda se mostraram mais eficientes do que um protocolo utilizando Kit (Arruda et al. 2017).

Foram comparados diferentes protocolos de extração de DNA em espécies da família Fabaceae produtoras de metabólitos secundários (Oliveira et al. 2017). Neste estudo, uma das principais alterações no protocolo de Doyle e Doyle 1990, foi a adição de acetato de sódio a 136,08 M para inibir a precipitação de polissacarídeos juntos do DNA. A partir disso, verificaram uma variação nas concentrações de 98 a 167 ng/ $\mu$ L.

Lima et al. (2020) observaram diferenças significativas entre protocolos de extração de DNA genômico de *Capsicum* spp., no qual em um foi utilizado o CTAB como detergente e no outro o SDS.

As grandes diferenças de concentrações de DNA observadas entre as quantificações realizadas por espectrofotometria (NanoDrop) e fluorometria (Qubit), podem ser explicadas porque na quantificação por absorvância a 260 nm, os resíduos de CTAB podem interferir, oferecendo assim resultados não confiáveis (Doyle e Doyle 1990). Todavia, outros contaminantes como RNA e fenóis também são absorvidos em  $A_{260}$ , dificultando a diferenciação na identificação do que está sendo quantificado. O alto peso molecular do DNA extraído pode acarretar na dificuldade de medir as concentrações de DNA com precisão e acurácia (Sambrook e Russell 2001). Por isso, recomenda-se que, neste trabalho sejam levados em consideração as concentrações obtidas a partir da estimativa realizada por fluorometria.

Apesar de este reagente, possivelmente interferir na quantificação da concentração das amostras por espectrofotometria, muitos protocolos para obtenção de material genômico já utilizam o CTAB em sua constituição (Devi et al. 2013) já que este detergente é responsável por atuar no rompimento da membrana celular que resulta na exposição do DNA (Romano e Brasileiro 1999).

Os parâmetros de pureza observados de DNA em relação a outros contaminantes (absorvância  $A_{260}/A_{230}$ ) devem variar de 2,0 a 2,2, e de DNA em relação a quantidade de proteínas (absorvância  $A_{260}/A_{280}$ ) de 1,8 a 2,0, para representar um DNA puro (Arruda et al. 2017). Dessa forma, nenhuma das médias das triplicatas se apresentou dentro do intervalo tido com padrão adequado para a absorvância  $A_{260}/A_{230}$ , e somente a média da triplicata do tratamento 7 se apresentou dentro dos parâmetros para  $A_{260}/A_{280}$  (1,9; Tabela 3). Porém, levando em consideração o desvio padrão, os tratamentos 4 e 8, apresentaram valores dentro deste intervalo (1, 8 e 2, respectivamente; Tabela 3).

Apesar de os resultados dos valores obtidos para as absorvâncias terem se apresentado fora do padrão que indicam pureza, as amostras oriundas dos oito tratamentos foram passíveis de amplificação para os três marcadores moleculares (Tabela 6), contudo, o uso do BSA como otimizador de PCR pode ter sido fundamental, sendo amplamente reportado na amplificação de DNA de espécies vegetais (Martins 2011, Bolson et al. 2015, Nasário 2018).

Uma alternativa para que os valores de absorvância  $A_{260}/A_{280}$ , relacionados à contaminação do DNA por proteínas, apresentem-se dentro do intervalo padrão para amostras puras, é a adição de fenol, cuja função é a desnaturação de proteínas. Após Arruda et al. (2017)



realizarem esta modificação na extração de DNA genômico de *Mimosa tenuiflora*, foi perceptível uma melhoria nos aspectos de pureza do DNA.

Em um estudo foram comparados quatro protocolos de extrações de DNA de folhas de espécies de *Capsicum* dos quais dois mostraram-se eficientes na absorvância  $A_{260}/A_{280}$ , enquanto que para  $A_{260}/A_{230}$  todos os métodos apresentaram valores muito abaixo do intervalo considerado como ótimo. De acordo com esse último parâmetro, os autores concluíram que as amostras apresentavam possível contaminação por RNAs e recomendam que a etapa de ressuspensão do DNA passe por um processo de otimização como sugestão a ser investigada em futuros estudos (Lima et al. 2020).

A separação do DNA dos metabólitos secundários é dificultosa, já que estes são liberados durante a lise celular e se ligam ao DNA e obstruem sua precipitação. Podem ainda dificultar a amplificação já que a extração de um DNA de boa qualidade é fundamental para posteriores estudos com PCR (Bressan et al. 2014, Raimundo et al. 2018).

Os tratamentos de 5 a 8 apresentaram intensidade maior de DNA degradado quando comparados aos tratamentos de 1 a 4 (Figura 2). Esses arrastos podem indicar a presença de DNases ou quebra mecânica do material durante o processo de extração de DNA (Romano e Brasileiro 1999). Assim, a fragmentação do material biológico em disruptor automático (tratamentos 5 a 8) pode ter resultado neste efeito.

O alto rendimento da extração de DNA pode estar relacionado à utilização do CTAB em todos os tratamentos, tendo em vista que este reagente auxilia tanto na lise celular quanto na precipitação do material genético, enquanto que o SDS está envolvido apenas na quebra da membrana celular (Ostrowska et al. 1998). É reportado que os protocolos em que se utiliza o CTAB resultam em DNA com maior quantidade em relação ao que utilizam o SDS como detergente em espécies de *Capsicum* (Lima et al. 2020).

Contudo, a qualidade do DNA extraído dessas amostras, além do protocolo de extração, depende também da composição do tecido foliar, da metodologia de coleta e preservação dos espécimes (Sahu et al. 2012). Em vista disso, a fixação e conservação do DNA pode ser realizada em preservação com etanol, que pode reduzir ou inativar metabólitos secundários que podem contaminar o DNA, ou até mesmo degradá-lo (Murray e Pitas 1996, Dhakshanamoorthy e Selvaraj 2009).

As amostras que amplificaram com o DNA não diluído para os três marcadores moleculares apresentam concentrações de DNA muito diferentes, dificultando assim, a possibilidade de relacionar o resultado da amplificação com a concentração. Apesar de todas as

amostras apresentarem concentrações de DNA consideradas favoráveis para uma amplificação, e ao menos 22 das 24 amostras, apresentarem banda visível em gel de agarose, o nível de impureza estava muito elevado (Todos os valores de absorbância  $A_{260}/A_{230} < 1,8$ ; Tabela 3). E, para que uma amplificação via PCR seja eficiente, é necessário que o DNA apresente concentrações necessárias para os diferentes tipos de marcadores e baixo grau de impureza (Oliveira et al. 2017)

Dessa forma, alguns dos fatores que podem interferir no rendimento das PCR's, são: a quantidade de DNA, levando em consideração o peso molecular apropriado para os possíveis marcadores moleculares a serem utilizados e a presença de inibidores no DNA extraído. Os inibidores agem na precipitação ou na desnaturação do DNA, ou até na capacidade da polimerase se ligar a íons de magnésio (Rossen et al. 1992)

Os inibidores enzimáticos podem se originar do tecido vegetal ou dos reagentes usados para o isolamento do DNA, diante disso, altas concentrações de CTAB também podem ser consideradas inibidores de PCR (Peist et al. 2001). Quantidades elevadas de proteína em amostras de DNA extraídas, também podem inibir as amplificações (Terry et al. 2002). A diluição de DNA ajuda a reduzir a concentração dos inibidores e elevam a eficiência da PCR. Contudo, a baixa concentração de DNA pode diminuir a sensibilidade da PCR (Lipp et al. 2005).

Levando em consideração as avaliações e discussões realizadas, para se obter um DNA com quantidade e qualidade que possibilitem a amplificação por PCR com a espécie *D. macrophylla*, são necessárias as seguintes modificações no protocolo de extração de Doyle e Doyle (1990): fragmentação do material vegetal em fragmentador automático, tempo e temperatura de digestão a 60 °C por 30 minutos e tempo e temperatura de precipitação a 37 °C *overnight*.

A partir dessas modificações poderão ser realizados estudos no âmbito da genética e biologia molecular com a espécie, visto que, é imprescindível que o DNA extraído apresente características que possibilitam a amplificação por PCR de regiões de interesse, e a partir disso, seja possível o acesso a informações genéticas.

## Capítulo II

---

Silva, J.N.; Ramos, S.L.F.; Nunez, C.V.;  
Batista, J.S. 2022. Prospecção de marcadores  
moleculares para o estudo da variabilidade  
genética de *Duroia macrophylla* Huber  
(Rubiaceae). Manuscrito formatado para *Acta  
Amazonica*.

## Resumo

*Duroia macrophylla* produz uma gama de substâncias com potencial bioativo, o que torna necessário o conhecimento sobre o nível de variabilidade e estruturação genética da espécie, para que sejam fornecidos subsídios para estratégias de conservação e manejo. Este conhecimento requer a utilização de marcadores moleculares com taxas de polimorfismos adequadas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o nível de polimorfismo de 13 marcadores moleculares cloroplastidiais e um nuclear (ITS), baseados em sequências de DNA, para futuros estudos genéticos populacionais da *D. macrophylla*. Para isso, foram caracterizados 15 espécimes a partir do sequenciamento com *primers* específicos correspondentes às regiões de interesse. As sequências nucleotídicas foram analisadas e editadas para construção de rede de haplótipos, cálculo dos índices de diversidade, distância genética, e busca por similaridade genética nos bancos de dados genéticos públicos (NCBI e BoldSystems). Foram recuperados 7289 pares de base (pb) do genoma cloroplastidial e 607 pb do marcador ITS. Detectaram-se mutações nos marcadores N, T3 e ITS, sendo que as sequências de ITS geraram quatro haplótipos e os índices de diversidade genética para este marcador mostraram-se superiores em relação aos cloroplastidiais, nos níveis intra e interespecífico (com sequências de espécies de *Duroia* depositadas no NCBI). O marcador ITS apresentou maiores níveis de polimorfismo comparado aos marcadores cloroplastidiais N e T3, os quais apresentaram baixos níveis e os outros 11 marcadores apresentaram-se monomórficos. Desta maneira, dentre os 14 marcadores avaliados, o marcador ITS pode ser o marcador baseado em sequência de DNA mais adequado para realização de estudos populacionais em *D. macrophylla*.

Palavras-chave: DNA cloroplastidial, DNA nuclear, apurú.

## 1. Introdução

Diversas regiões do genoma plastidial, sejam estas referentes a regiões codificantes, íntrons ou espaçadores intergênicos, têm sido extensivamente utilizadas em vários estudos genéticos em que sua aplicação está relacionada a identificação de espécies, filogenia e diversidade genética (Mezzasalma et al. 2017, Chung et al. 2019, Vasconcelos et al. 2021).

O grau de conhecimento sobre os níveis de variação entre essas diferentes regiões não codificadoras ainda é baixo, limitando o acesso sobre as utilidades e potenciais que esses marcadores moleculares podem oferecer, por isso, a descoberta adicional dessas regiões com altos níveis de variabilidade se torna útil na aplicação de estudos de biologia evolutiva e sistemática molecular, na elucidação da origem de espécies domesticadas, no rastreamento de movimentos biogeográficos e na resolução de complexo de relações entre espécies (Shaw et al. 2007).

Uma das regiões não codificadoras utilizadas como marcador molecular em estudos genéticos é o espaçador intergênico não transcrito denominado *psbA-trnH*. Essa região é relativamente pequena, com tamanho que varia de 200 a 500 pb, apresenta alta variabilidade entre as angiospermas e aparentemente ausência de função (Štorchová e Olson 2007). Outra região não codificadora também utilizada como marcador, é o íntron do gene *rps16* (*rps16* íntron), que é pertencente a classe B1 do grupo II dos íntrons. O *rps16* é um gene que codifica a proteína ribossomal S16 e apresenta um tamanho de cerca de 800 pb (Ryzhova et al. 2009).

Dentre os marcadores codificantes oriundos do DNAcp que são utilizados em estudos genéticos, pode-se destacar: a maturase K (*matK*) e a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (*rbcL*). O *matK* é um gene codificador de maturase localizado no íntron de *trnK*, com tamanho de cerca de 1500 pb (Stanford et al. 2000). O *rbcL* é um gene que é responsável pela produção da enzima ribulose-1,5-bisfosfato (Clegg et al. 1994), mais comumente conhecida por RuBisCO é utilizada no ciclo de Calvin para catalisar o primeiro grande passo de fixação de carbono (Parry et al. 2008) com tamanho em torno de 1400 pb (Mishra et al. 2016).

Um dos marcadores moleculares oriundos do DNA nuclear mais utilizados em estudos genéticos em espécies vegetais é o *internal transcribed spacer* (ITS), que é uma região do cístron ribossômico nuclear, que pode ser sequenciada com o uso de *primers* universais em linhagens vegetais (Li et al. 2015). Além disso, podem apresentar variações no DNA com eventos de SNP's ou *indels* (inserções/deleção) (Álvarez e Wendel 2003).

Alguns marcadores, tanto do genoma cloroplastidial quanto do nuclear, são considerados códigos de barra (*barcodes*). A partir dos quais é possível atribuir espécimes biológicos a uma determinada espécie. Essa atribuição é baseada na comparação da composição de sequências nucleotídicas de uma região do genoma padrão do espécime com aquelas armazenadas em banco de dados públicos (Casiraghi et al. 2010).

*Duroia macrophylla* é uma árvore frutífera pertencente à Família Rubiaceae, que tem como uma das principais características a produção de substâncias com atividades biológicas (Nunez e Vasconcelos 2012, Martins et al. 2014a, 2014b, Carvalho et al. 2022). Devido ao potencial biotecnológico que a espécie apresenta, é fundamental que seja realizado um rastreamento de marcadores moleculares afim de investigar o nível de polimorfismo que estes apresentam, para que possam ser utilizados em estudos populacionais que envolvam o conhecimento sobre a variabilidade e estruturação genética da espécie.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o nível de polimorfismo de marcadores moleculares cloroplastidiais e nuclear (ITS), baseados em sequências de DNA, que possam ser disponibilizados à estudos genéticos populacional da *D. macrophylla*

## 2. Material e métodos

Foram coletados 15 espécimes de *D. macrophylla* na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada na cidade de Manaus, Amazonas, que apresentavam uma distância mínima de 50 m entre eles. A autorização para realizar o experimento foi disponibilizada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN N° AE23A4A). E, o depósito da exsicata foi realizada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) cujo número é o 291916.

Foi realizada a extração de DNA genômico desses espécimes a partir do protocolo de Doyle e Doyle (1990) com as modificações realizadas no tratamento 6 (Capítulo I). No qual, a fragmentação foi realizada com o auxílio de duas esferas (*beads*) de 5 mm no disruptor automático BeadBeater (Biospec Products). Na etapa de digestão, as amostras de folhas de *D. macrophylla* foram incubadas a 60 °C por 30 minutos, em uma incubadora com agitação *Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific) e a precipitação do DNA a -20 °C por *overnight*. Após a extração de DNA, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a qualidade quanto à sua integridade e estimar a concentração.

A PCR de 14 marcadores moleculares (Tabela 1) foi realizada em um volume final de 15 µL, com a utilização de 7,5 µL do tampão 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega), que

contém dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfato) (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (25 mM) e Taq DNA polimerase (5U/μL). Foram adicionados também, 1 μL tanto do *primer forward* quanto do *reverse* (5 μM cada), 0,75 μL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 5 mg/mL, 3,75 μL de água ultrapura e 1 μL de DNA extraído (aproximadamente 50 ng/μL). Em seguida levada ao termociclador (Veriti® *Thermal Cycler*-ThermoFisher). Para o marcador *rbcL*, foram utilizados os *primers* externos (*rbcL*-1F e *rbcL*-1367R) e para o *matK* foi utilizado o *primer* F externo (*matK*-400F).

Tabela 1 - Marcadores moleculares utilizados nas ampliações via PCR de 10 a 15 espécimes de *Duroia macrophylla*, destacando seus respectivos pares de *primers* e perfis de amplificação.

Marcador molecular	Tamanho esperado (pb)	Nome dos <i>primers</i>	Perfil de amplificação	Referência
ITS	500	ITS-5 <sup>a</sup>	94°C -2' [x35: 94°C- 1',	Stanford et al. (2000)
		ITS-4	54°C-1', 72°C- 2'] 72°C- 5'	
<i>matK</i>	1500	<i>matK</i> -400F <i>matK</i> -842F	95°C -1' [x35: 95°C- 1', 54°C-1', 72°C- 2'] 72°C- 10'	Cameron et al. (2001)
<i>psbA-trnH</i>	400	<i>psbA</i> -F <i>trnH</i> -R	80°C -5' [x35: 94°C- 30'', 56°C-40'', 72°C- 1'] 72°C- 10'	Taberlet et al. (1991)
<i>rbcL</i>	1400	<i>rbcL</i> -1F <i>rbcL</i> -636F <i>rbcL</i> -724R <i>rbcL</i> -1367R	80°C -30'' [x35: 95°C- 1', 58°C-1', 65°C- 2'] 65°C- 10'	Cameron et al. (2001)
<i>rps16</i> íntron	800	<i>rps</i> -F <i>rps</i> -R	95°C -1'30'' [x35: 95°C- 50'', 60°C-50'', 72°C- 1'50''] 72°C- 1'	Persson (2000)
Nove marcadores	Tabela 2		80°C -5' [x30: 95°C- 1', 50°C-1' (ramp 0,3°C/s) até 65°C- 4'] 65°C- 5'	Shaw et al. (2007)

Foram selecionados nove marcadores (C, L, M, N, O, P, Q, T3, U) a partir do estudo de Shaw et al. (2007) (Tabela 2). O *rbcL* e *matK* foram selecionados por serem considerados *barcodes* para plantas de acordo com o BoldSystems v4 (Barcode of Life Data). O *rps16* íntron e *psbA-trnH* foram selecionados por possuírem sequências de espécies do gênero *Duroia* depositadas no NCBI (*National Center Biotechnology Information*). Os marcadores citados anteriormente são referentes ao DNACp, em contrapartida, também foi selecionado o ITS para obtenção de informações oriundas também do DNAn.

Tabela 2 - Marcadores cloroplastidiais referentes a regiões não codificadoras com seus respectivos códigos e *primers* disponibilizados no trabalho de Shaw et al. (2007) utilizados na amplificação e sequenciamento de DNA.

Código	Tamanho esperado (pb)	Região	Nome dos <i>primers</i> e sequências (5'- 3')
C	700	trnS-trnG-trnG	trnG <sup>(UUC)</sup> : GAATCGAACCCGCATCGTTAG trnS <sup>(GCU)</sup> : AACTCGTACAACGGATTAGCAATC
L	1000	rpl14-rps8-infA-rpl36	rpL14: AAGGAAATCCAAAAGGAACTCG rpL36: GGRTTGGAACAAATTACTATAAATTCG
M	1100	petL-psbE	petL: AGTAGAAAACCGAAATAACTAGTTA psbE: TATCGAATACTGGTAATAATATCA GC
N	1000	psbJ-petA	psbJ: ATAGGTACTGTARCYGGTATT petA: AACARTTYGARAAGGTTCAATT accD: AATYGTACCACGTAATCYTTTAAA
O	600	psaI-accD	psaI-75R: AGAAGCCATTGCAATTGCCGGAAA trnV <sup>(UAC)</sup> x2: GTC TAC GGT TCG ART CCG TA
P	1100	3'trnV-ndhC	ndhC:TATTATTAGAAATGYCCARAAAATAT CATATTC
Q	600	ndhJ-trnF	ndhJ: ATGCCYGAAAGTTGGATAGG TabE: GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
T3	700	3'rps16-5'trnK	rpS16x2F2: AAAGTGGGTTTTTATGATCC trnK <sup>(UUU)</sup> x1: TTAAAAGCCGAGTACTCTACC
U	1100	ndhA intron	ndhAx1: GCYCAATCWATTAGTTATGAAATACC ndhAx2: GGTTGACGCCAMARATTCCA

Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o marcador molecular 1kb *plus*. Posteriormente estes produtos foram purificados usando PEG 8000 (polietilenoglicol) (Lis e Schleif 1975) com o objetivo de remover os *primers* e os dNTPs não incorporados da reação de PCR, de modo que estes não interferissem na reação de sequenciamento nucleotídico.

Os produtos purificados foram visualizados em gel de agarose 1%, utilizando o marcador molecular 1 kb *plus*. Após isso, foi realizado a reação de sequenciamento nucleotídico com o uso do kit *BigDye™ Terminator v3. 1 Cycle Sequencing* (ThermoFisher) seguindo as recomendações do fabricante, o *primer (forward ou reverse)* (5 µM) utilizado na PCR para cada marcador molecular. Para o gene *matK* foi utilizado o *primer forward* interno (*matK*- 842F) e para o *rbcL* foram utilizados os *primers* internos (*rbcL*-636F e *rbcL*-742R). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de 96 °C por 2 minutos, 35 ciclos de (96 °C por 30 segundos, 50 °C por 20 segundos) e 60 °C por 4 minutos.

Posteriormente, foi realizada a reação de precipitação seguindo o protocolo com etanol e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) sugerido pelo fabricante do kit de sequenciamento de DNA *BigDye Terminator Ver 3.1* (Thermo Fisher Scientific), e em seguida a placa foi



submetida a eletroforese capilar (*ABI 3130xl* – ThermoFisher). As sequências nucleotídicas foram analisadas, conferidas e editadas com o auxílio dos programas *CHROMAS 2.6.6* (Technelysium Pty Ltd) e *BioEdit 7.2.5* (Hall 1999).

A rede de haplótipos foi gerada no programa R (R Core Team, 2022) utilizando os pacotes *ape* (Paradis e Schliep 2019) e *pegas* (Paradis 2010) para as 15 sequências de ITS de *D. macrophylla* obtidas.

Os índices de diversidade genética: número de sítios polimórficos (S), número total de mutações (Eta), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foram calculados com auxílio do programa *DnaSP v6.12.03* (Rozas et al. 2017). A partir do qual também foram identificados os sítios polimórficos. Essa estimativa foi realizada com os marcadores que apresentaram polimorfismo no nível intraespecífico e no nível interespecífico com os marcadores para os quais há depósitos no banco de dados genéticos público para espécies pertencentes ao gênero *Duroia*.

A matriz de distância genética (%) par a par foi calculada usando o modelo de Kimura-2- parâmetros (K2P) (Kimura 1980) no programa *MEGA v.11* (Tamura et al. 2021) no nível intra (espécimes de *D. macrophylla*) e interespecífico (*D. macrophylla*, *D. aquatica*, *D. eriopila* e *D. hirsuta*) com o marcador ITS.

As buscas por similaridade genética foram realizadas com o auxílio da ferramenta *BlastN* e *BlastX* no banco de dados genéticos público NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e no *BoldSystems* (<http://v4.boldsystems.org/>) (Ratnasingham e Hebert 2007) até 01/07/2022 e considerados os valores acima de 94% (*BlastN*) e 98% (*BlastX*) de similaridade.

As árvores de distância *Neighbor-Joining* (NJ) foram construídas usando o modelo de Kimura- 2- parâmetros (K2P) (Kimura 1980) no programa *MEGA v.11* (Tamura et al. 2021), para a árvore foi utilizado o suporte de *bootstrap* com 1000 replicações.

Foram utilizadas sequências de 18 diferentes espécies de Rubiaceae depositadas nos bancos de dados genéticos públicos NCBI e *BoldSystems* para a realização das diferentes análises genéticas, pois foram as que apresentaram maiores percentuais de similaridade com as sequências de *D. macrophylla*, com os marcadores ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL* e *rps16* íntron (Tabela 3).

Tabela 3 - Acesso às sequências de DNA obtidas a partir dos bancos de dados NCBI e BoldSystems, com a espécie, marcador e número de acesso correspondentes, bem como a quais análises genéticas as sequências foram submetidas.

Espécie	Marcador	Nº de acesso	Análises genéticas	Banco de dados
<i>Duroia aquatica</i>	ITS	AF183782.1 e AF183783.1	Matriz de distância genética, índices de diversidade genética e árvores de distância genética	NCBI
<i>Duroia eriopila</i>		MK123590.1		
<i>Duroia hirsuta</i>		AF183787.1 e AF183786.1		
<i>Duroia eriopila</i>	<i>matK</i>	KJ815770.1	Índices de diversidade genética e árvores de distância genética	NCBI
<i>Duroia aquatica</i>	<i>psbA-trnH</i>	FJ039038.2	Índices de diversidade genética	
<i>Duroia eriopila</i>		KX248326.1		
<i>Duroia longiflora</i>		GQ428645.1		
<i>Duroia aquatica</i>	<i>rbcL</i>	JQ625889.1	Índices de diversidade genética e árvores de distância genética	
<i>Duroia eriopila</i>		JQ626024.1		
<i>Duroia hirsuta</i>		AJ286696.1		
<i>Duroia longiflora</i>		JQ626252.1		
<i>Duroia eriopila</i>	<i>rps16</i> íntron	KF964930.1	Índices de diversidade genética	
<i>Duroia hirsuta</i>		AF200994.1		
<i>Duroia eriopila</i>	<i>matK</i>	KJ815770.1	Árvores de distância genética	
<i>Amaioua guianensis</i>		JQ626364.1		
<i>Coddia rudis</i>		KJ136876.1		
<i>Pavetta hongkongensis</i>		KX911107.1		
<i>Stachyarrhena heterochroa</i>		KJ815771.1		
<i>Duroia eriopila</i>	<i>rbcL</i>	JQ626024.1	Árvores de distância genética	
<i>Amaioua guianensis</i>		JQ625864.2		
<i>Coddia rudis</i>		AJ286695.1		
<i>Pavetta hongkongensis</i>		KX910889.1		
<i>Stachyarrhena heterochroa</i>		KY348836.1		
<i>Duroia eriopila</i>	<i>matK</i>	FJ514670		BoldSystems
<i>Aulacocalyx jasminiflora</i>		KJ136869		

Espécie	Marcador	Nº de acesso	Análises genéticas	conclusão Banco de dados
<i>Pleiocoryne fernandensis</i>	<i>matK</i>	KJ136891	Árvores de distância genética	BoldSystems
<i>Mitriostigma axillare</i>		AY538405		
<i>Coffea arabica</i>		DQ401346		
<i>Vallesia antillana</i>		AM295075		
<i>Duroia aquatica</i>		JQ625889		
<i>Duroia eriopila</i>		JQ626024		
<i>Duroia hirsuta</i>		AJ286696		
<i>Duroia longiflora</i>	JQ626252			
<i>Wendlandia uvariifolia</i>	<i>rbcL</i>	KJ680447		
<i>Kraussia floribunda</i>		KF964848		
<i>Rothmannia capensis</i>		AM235112		
<i>Hyperacanthus amoenus</i>		KF964840		
<i>Catunaregam spinosa</i>		KX910827		

### 3. Resultados

#### 3.1 Diversidade genética em *Duroia macrophylla*

As 13 regiões do genoma cloroplastidial recuperaram um total de 7289 pb (Figura 1), sendo que 5997 pb são referentes às 11 regiões não codificadoras (C, L, M, N, O, P, Q, T3, U, *psbA-trnH* e *rps16* íntron) e 1292 pb às duas regiões codificadoras (*matK* e *rbcL*). O sequenciamento do ITS, oriundo do genoma nuclear, permitiu a recuperação de 607 pb.

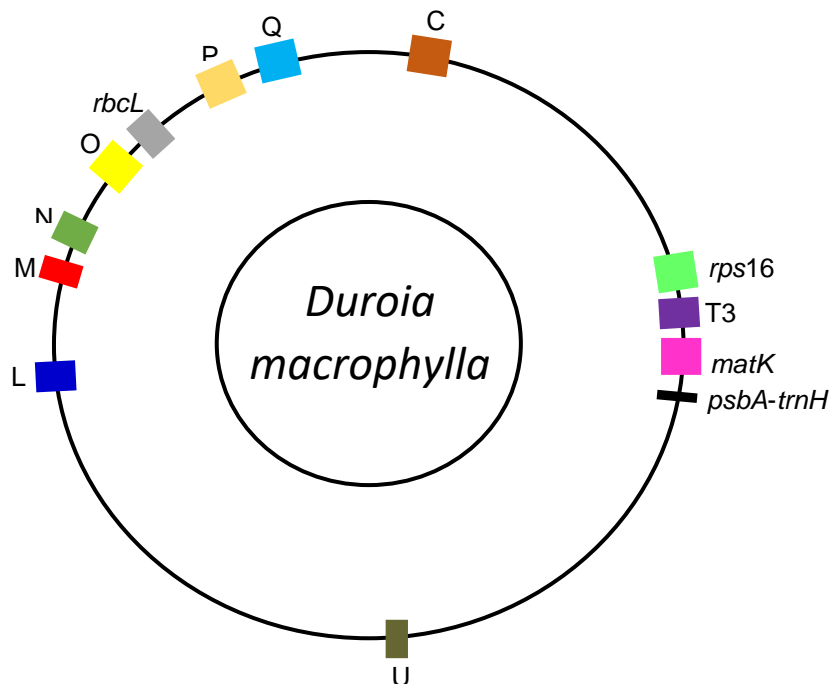


Figura 1 - Representação das 13 regiões nucleotídicas sequenciadas do genoma cloroplastidial de *Duroia macrophylla*, totalizando 7289 pb, levando em consideração a localização no referido genoma de *Coffea arabica* (Rubiaceae).

Foram detectadas mutações gênicas em três das 14 regiões do DNA entre os espécimes de *D. macrophylla*, sendo duas no DNAcP (N e T3) e uma no DNAn (ITS). Enquanto que as 11 regiões restantes (*matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *rps16* íntron, C, L, M, O, P, Q e U) se apresentaram monomórficas (Tabela 4).

Tabela 4 - Tamanho dos fragmentos recuperados, número de amostras de *Duroia macrophylla* sequenciadas (N) e detecção de mutação para 14 marcadores moleculares oriundos do genoma nuclear ou cloroplastidial.

Marcador	Origem do genoma	Tamanho do fragmento (pb)	N	Deteção de mutação
ITS	Nuclear	607	15	X
<i>matK</i>	Cloroplastidial	694	15	
<i>psbA-trnH</i>		291	15	
<i>rbcL</i>		598	11	
<i>rps16</i> íntron		647	15	

C	640	13	
L	506	14	
M	469	14	
N	555	10	X
O	631	11	
P	632	12	
Q	627	10	
T3	534	12	X
U	465	13	

O maior número de mutações (quatro) foi observado com o marcador ITS, sendo uma transição de G/A no sítio 56, uma transição de C/T no sítio 181, uma transversão de C/A no sítio 453 e uma transversão de T/G no sítio 456. O marcador N revelou uma transição de A/G no sítio 166 e no T3 foi verificado um *indel* (inserção ou deleção) no sítio 124.

A rede de haplótipos com 15 sequências do ITS de *D. macrophylla* apresentou quatro haplótipos com frequência variando entre um (haplótipo III) a nove (haplótipo II) (Figura 2).

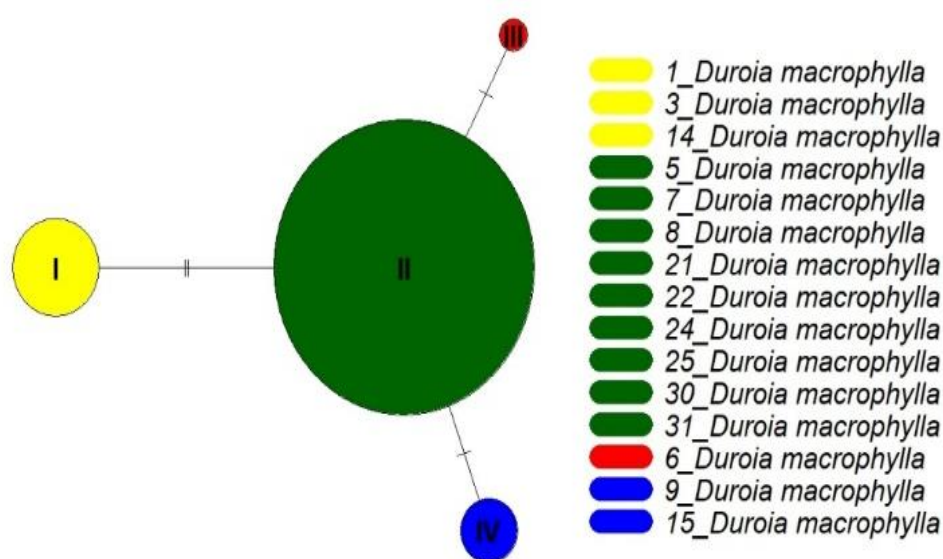


Figura 2 - Rede de haplótipos de *Duroia macrophylla* com sequências nucleotídicas do marcador ITS. Na rede, os círculos representam os quatro haplótipos (I a IV) com tamanhos proporcionais ao número de espécimes que são ligados por ramos e os traços nos ramos representam as mutações entre os haplótipos.

O baixo nível e a ausência de polimorfismo detectados entre os 14 marcadores moleculares no nível intraespecífico para os espécimes de *D. macrophylla*, resultou na necessidade de comparar espécies de *Duroia* que apresentem sequências para esses marcadores disponíveis no NCBI, com intuito de as possíveis variações serem avaliadas no nível interespecífico.

O marcador ITS apresentou maiores valores para todos os índices de diversidade genética calculados comparado com o marcador cloroplastidial N. Este resultado foi observado tanto no nível intraespecífico quanto interespecífico ao ser considerado para os marcadores ITS: *D. aquatica*, *D. eriopila* e *D. hirsuta*; *matK*: *D. eriopila*; *rbcL*: *D. aquatica*, *D. eriopila*, *D. hirsuta* e *D. longiflora* e *rps16* íntron: *D. eriopila* e *D. hirsuta*). Os *gaps* não são considerados na contagem do número de sítios polimórficos nessa estimativa (Tabela 5).

Tabela 5 - Índices de diversidade genética no nível intraespecífico para espécimes de *Duroia macrophylla* obtidos a partir das sequências nucleotídicas dos marcadores moleculares ITS e N e no nível interespecífico entre sequências de *D. macrophylla* e de outras espécies de *Duroia* depositadas no NCBI para cinco marcadores: ITS (*D. aquatica*, *D. eriopila* e *D. hirsuta*), *matK* (*D. eriopila*), *rbcL* (*D. aquatica*, *D. eriopila*, *D. hirsuta* e *D. longiflora*) e *rps16* íntron (*D. eriopila* e *D. hirsuta*).

Índices de diversidade genética						
Nível intraespecífico						
Marcador	N	S	Eta	h	Hd	$\pi$
ITS	15	4	4	4	0,619 ± 0,120	0,0017 ± 0,0004
N	10	1	1	2	0,533 ± 0,095	0,0009 ± 0,0001
Nível interespecífico						
Marcador	N	S	Eta	h	Hd	$\pi$
ITS	18	34	35	7	0,739 ± 0,099	0,0126 ± 0,0054
<i>matK</i>	16	4	4	2	0,125 ± 0,106	0,0007 ± 0,0006
<i>rbcL</i>	15	7	7	5	0,476 ± 0,155	0,0024 ± 0,0009
<i>rps16</i> íntron	17	16	16	3	0,228 ± 0,129	0,0034 ± 0,0026

N: número de sequências, S: Número de sítios polimórficos, Eta: Número total de mutações, h: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica,  $\pi$ : diversidade nucleotídica

O número de sítios polimórficos observados no alinhamento nucleotídico de cinco marcadores (ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL* e *rps16* íntron) de *D. macrophylla* e de outras espécies de *Duroia*, com sequências depositadas no NCBI e levando em consideração os *gaps*, variou de quatro (*matK*) a 29 (ITS) (Tabela 6).

Os valores de distância genética no nível intraespecífico com o ITS calculados para *D. macrophylla* variaram de 0,002 a 0,007%, com média de 0,005%, enquanto que as distâncias interespecíficas entre 0,015 (Haplótipo I- *D. macrophylla* e *D. eriopila*) a 0,065% (*D. aquatica* e *D. hirsuta*) com média de 0,038% (Tabela 7).

Tabela 6 - Alinhamento nucleotídico com os sítios polimórficos observados em sequências de DNA dos marcadores ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL* e *rps16* íntron, depositadas no NCBI, para *Duroia macrophylla* e outras espécies de *Duroia*.

		ITS – 602 pb (29 sítios polimórficos)																
		56	62	65	69	70	98	120	121	124	166	181	185	204	225	428	453	454
<i>D. macrophylla</i>	G/A	A	T	A	A	T	C	T	C	G	C/T	T	A	T	G	C/A	-	
<i>D. aquatica</i>	G	G	-	G	A	C	T	G	G	A	C	C	G	T	N	N	N	
<i>D. eriopila</i>	G	G	-	G	C	C	C	G	C	A	C	T	A	C	-	C	C	
<i>D. hirsuta</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	C	-	
		456	520	532	538	545	586	588	589	590	591	594	597					
<i>D. macrophylla</i>	T/G	C	A	C	G	C	C	T	-	-	A	G						
<i>D. aquatica</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N						
<i>D. eriopila</i>	T	C	A	-	G	C	C	T	-	-	A	G						
<i>D. hirsuta</i>	T	A	G	C	A	G	G	A	A	A	G	T						
		<i>matK</i> – 694 pb (4 sítios polimórficos)																
		2	3	15	532													
<i>D. macrophylla</i>	T	C	C	C														
<i>D. eriopila</i>	C	A	T	T														
		<i>psbA-trnH</i> – 290 pb (11 sítios polimórficos)																
		194	195	273	274	275	276	277	278	279	280	281						
<i>D. macrophylla</i>	-	T	G	A	T	G	T	A	G	C	C							
<i>D. aquatica</i>	G	T	G	A	T	G	T	A	G	C	C							
<i>D. longiflora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
		<i>rbcL</i> – 598 pb (7 sítios polimórficos)																
		2	41	47	62	199	445	478										
<i>D. macrophylla</i>	A	G	A	G	T	T	C											
<i>D. aquatica</i>	C	A	T	G	T	T	C											
<i>D. eriopila</i>	A	G	A	A	T	T	C											
<i>D. hirsuta</i>	A	G	A	G	G	C	A											
<i>D. longiflora</i>	A	G	A	A	G	T	C											
		<i>rps16</i> íntron – 581 pb (17 sítios polimórficos)																
		162	488	489	491	493	496	504	506	521	523	529	535	553	559	560	561	562
<i>D. macrophylla</i>	T	G	A	C	A	T	A	C	A	T	T	C	T	-	-	A	G	
<i>D. eriopila</i>	C	A	G	T	-	T	T	T	G	A	T	A	A	A	G	A	A	
<i>D. hirsuta</i>	C	G	A	C	A	-	A	C	A	T	T	C	T	C	A	G	G	

Tabela 7 - Matriz de distância genética (%) corrigida (K2P) par a par utilizando sequências de DNA de ITS no nível intraespecífico de 15 espécimes de *Duroia macrophylla* e interespecífico com as espécies *D. aquatica*, *D. eriopila* e *D. hirsuta* obtidas a partir do NCBI. Em negrito, os valores referentes ao desvio padrão.

		<i>Duroia macrophylla</i>				<i>Duroia aquatica</i>	<i>Duroia eriopila</i>	<i>Duroia hirsuta</i>
		Haplótipo I	Haplótipo II	Haplótipo III	Haplótipo IV			
<i>Duroia macrophylla</i>	Haplótipo I		<b>0,003</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,008</b>	<b>0,006</b>	<b>0,012</b>
	Haplótipo II	0,005		<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	<b>0,007</b>	<b>0,012</b>
	Haplótipo III	0,007	0,002		<b>0,003</b>	<b>0,009</b>	<b>0,007</b>	<b>0,013</b>
	Haplótipo IV	0,007	0,002	0,005		<b>0,009</b>	<b>0,007</b>	<b>0,013</b>
	<i>Duroia aquatica</i>	0,022	0,027	0,029	0,029		<b>0,007</b>	<b>0,013</b>
	<i>Duroia eriopila</i>	0,015	0,019	0,022	0,022	0,017		<b>0,013</b>
	<i>Duroia hirsuta</i>	0,055	0,060	0,062	0,063	0,065	0,062	



## 3.2 Busca por similaridade genética nos bancos de dados genéticos

### 3.2.1 BlastN (NCBI) e BoldSystems

A análise do BlastN realizada no NCBI permitiu a comparação das sequências dos 14 marcadores de *D. macrophylla* com cinco diferentes espécies pertencentes à Rubiaceae: *D. eriopila*, *D. hirsuta*, *Stachyarrhena heterochroa*, *Alberta magna* e *Luculia grandifolia*, com níveis de similaridade que variaram de 94 a 100% (Tabela 8).

Embora tenha depósito de sequências nucleotídicas de *matK* e *rbcL* de espécies de *Duroia* depositadas na plataforma BoldSystems, a busca por similaridade mostrou percentuais com espécies pertencentes a outros gêneros de Rubiaceae, com 98,6% para *Aulacocalyx jasminiflora* e 99,3% para *Catunaregam spinosa*.

### 3.2.2 BlastX (NCBI)

A busca por similaridade genética entre as sequências nucleotídicas obtidas com as de regiões codificadoras de proteínas depositadas no banco de dados NCBI (Tabela 9) mostrou que seis regiões não codificadoras (ITS, *rps16* íntron, C, N, Q e U) apresentaram percentuais de similaridade que variaram de 61,5 a 100% com proteínas hipotéticas. As regiões L e T3, que também são caracterizadas como não codificadoras, mostraram altos percentuais de similaridade com a proteína ribossomal S8 e S16, respectivamente. Para as outras quatro regiões não codificadoras restantes (*psbA-trnH*, M, O e P) não foram encontradas sequências similares. Enquanto que as duas regiões codificadoras (*matK* e *rbcL*) mostraram resultados correspondentes às suas respectivas funções.

Tabela 8 - Percentual de similaridade genética observada em sequências de DNA de 14 marcadores de *Duroia macrophylla* depositadas no NCBI e de *matK* e *rbcL* depositadas no BoldSystems

Marcador	BlastN (NCBI)			BoldSystems		
	Espécie	Similaridade (%)	Número de acesso	Espécie	Similaridade (%)	Número de acesso
ITS	<i>Duroia eriopila</i>	98,2	MK123590.1	-	-	-
<i>matK</i>	<i>Duroia eriopila</i>	99,7	KJ815770.1	<i>Aulacocalyx jasminiflora</i>	98,6	KJ136869
<i>psbA-trnH</i>	<i>Duroia eriopila</i>	100,0	FJ039038.2	-	-	-
<i>rbcL</i>	<i>Duroia eriopila</i>	99,8	JQ626024.1	<i>Catunaregam spinosa</i>	99,3	KX910827
<i>rps16</i> íntron	<i>Duroia hirsuta</i>	99,2	AF200994.1	-	-	-
C	<i>Stachyarrhena heterochroa</i>	97,8	KY348836.1	-	-	-
L	<i>Stachyarrhena heterochroa</i>	98,6	KY348836.1	-	-	-
M	<i>Alberta magna</i>	96,0	KY348839.1	-	-	-
N	<i>Stachyarrhena heterochroa</i>	98,1	KY348836.1	-	-	-
O	<i>Stachyarrhena heterochroa</i>	94,0	KY348836.1	-	-	-
P	<i>Alberta magna</i>	97,6	KY348839.1	-	-	-
Q	<i>Stachyarrhena heterochroa</i>	98,2	KY348836.1	-	-	-
T3	<i>Luculia grandifolia</i>	96,8	<u>KY378705.1</u>	-	-	-
U	<i>Stachyarrhena heterochroa</i>	98,8	KY348836.1	-	-	-

Tabela 9 - Percentual de similaridade genética de sequências de DNA de 14 marcadores de *Duroia macrophylla* obtidas na análise de BlastX no NCBI. Foram encontrados resultados para 11 dos 14 marcadores.

BlastX (NCBI)				
Marcador	Região	Proteína (espécie)	Similaridade (%)	Número de acesso
ITS	NC	Proteína hipotética GBA52 ( <i>Prunus armeniaca</i> )	94,6	KAH0983195.1
<i>matK</i>	C	maturase K ( <i>Duroia eriopila</i> )	99,5	AKF35606.1
<i>rbcL</i>	C	ribulose-1,5 bifosfato ( <i>Psydrax obovata</i> )	100	CAJ86982.1
<i>rps16</i> íntron	NC	Proteína hipotética ( <i>Photobacterium alginatilyticum</i> )	74,1	WP_205298647.1
C	NC	Proteína hipotética M569_00588 ( <i>Genlisea aurea</i> )	100	EPS74167.1
L	NC	Proteína ribossomal S8 M569_00588 ( <i>Stachyarrhena heterochroa</i> )	97	QIS91471.1
N	NC	Proteína hipotética LCE14_pgp040 ( <i>Camellia debaensis</i> )	77,7	YP_010174923.1
Q	NC	Proteína hipotética MTR_4g035030 ( <i>Medicago truncatula</i> )	96	AES87819.1
T3	NC	Proteína ribossomal S16 ( <i>Stachyarrhena heterochroa</i> )	100	QIS91417.1
U	NC	Proteína hipotética ES319_D02G105700v1 ( <i>Gossypium barbadense</i> )	61,5	KAB2040771.1

NC: Não codificante, C: Codificante

### 3.3 Árvores de distância genética no nível intra e interespecífico

A construção de árvore de distância genética é fundamental para possibilitar a verificação de potencial dos marcadores moleculares na diferenciação de táxons, neste caso, de espécies, por mais que o nível de polimorfismo tenha sido baixo também no nível interespecífico. Dessa forma, também pode ser validado o desempenho dos marcadores *matK* e *rbcL* como *barcodes*, para os quais as aplicabilidades estão relacionadas à distinção e identificação de espécies.

#### 3.3.1 *Duroia macrophylla* e espécies de *Duroia* com sequências depositadas no NCBI

##### 3.3.1.1 ITS

As sequências de *D. macrophylla* formaram um grupo com suporte de *bootstrap* de 94, no qual é possível verificar dois subgrupos, o primeiro constituído pelos haplótipos H2, H3 e

H4 com suporte de *bootstrap* de 86 e o segundo pelo haplótipo H1. A árvore ainda permite a verificação de que as espécies *D. aquatica* e *D. eriopila* estão geneticamente mais próximas a *D. macrophylla* do que a *D. hirsuta* (Figura 3).

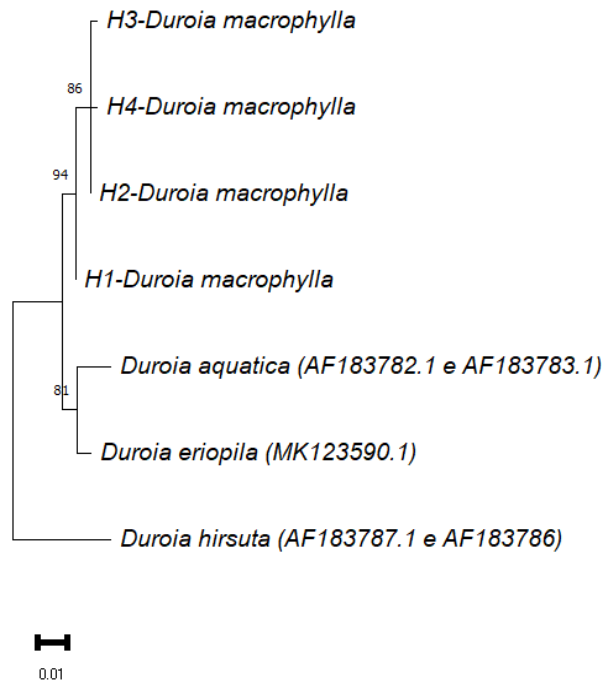


Figura 3 - Árvore de distância genética *Neighbor-Joining* (NJ) com espécimes de *Duroia macrophylla* e de três espécies de *Duroia* (*D. aquatica*, *D. eriopila* e *D. hirsuta*) cujas sequências foram obtidas no NCBI com o marcador ITS. Valores de suporte de *bootstrap* entre 81 e 94.

### 3.3.1.2 *matK*

Com as 15 sequências nucleotídicas do marcador *matK* de *D. macrophylla* obtidas e com a sequência de DNA de *D. eriopila* a partir do BlastN no NCBI permitiu a geração de dois grupos distintos, cada um constituído de uma espécie de *Duroia* (Figura 4).

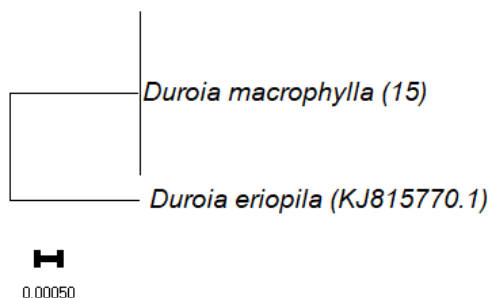


Figura 4 - Árvore de distância genética *Neighbor-Joining* (NJ) com espécimes de *Duroia macrophylla* e de *D. eriopila* cuja sequência foi obtida no NCBI com o marcador *matK*.

### 3.3.1.3 *rbcL*

A espécie *D. aquatica* foi agrupada juntamente com os 11 espécimes de *D. macrophylla* considerando as sequências de DNA do marcador *rbcL*, porém entre as sequências dessas duas espécies foram detectadas uma transição e duas transversões. Enquanto *D. hirsuta*, *D. eriopila* e *D. longiflora* formaram um outro grupo, na qual as duas últimas aparecem geneticamente mais próximas, porém com baixos valores de suporte (Figura 5).

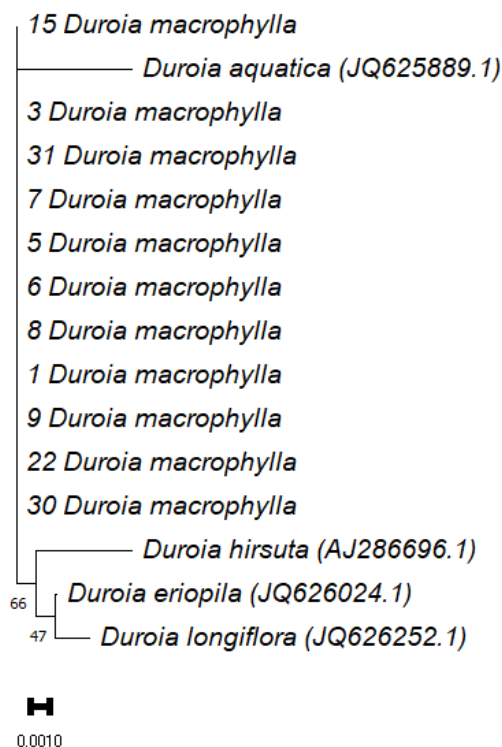


Figura 5 - Árvore de distância genética *Neighbor-Joining* (NJ) com espécimes de *Duroia macrophylla* e de quatro espécies de *Duroia* (*D. aquatica*, *D. eriopila*, *D. hirsuta* e *D. longiflora*) cujas sequências foram obtidas no NCBI com o marcador *rbcL*. Valores de *bootstrap* entre 47 e 66.

### 3.3.2 *Duroia macrophylla* em relação às cinco espécies vegetais com maiores percentuais de similaridade

#### 3.3.2.1 NCBI

A árvore com as sequências de *matK* e *rbcL* concatenadas (1292 pb) de *D. macrophylla* juntamente com as cinco espécies que apresentaram maiores percentuais de similaridade, recuperou dois grupos com suporte de *bootstrap* que variou de 64 a 84. Um grupo composto pelos 11 espécimes de *D. macrophylla* e *D. eriopila*, outro por *Amaioua guianensis*, *Coddia rudis* e *Pavetta hongkongensis* e um terceiro mais distante geneticamente das outras espécies, constituído por *Stachyarrhena heterochroa* (Figura 6).

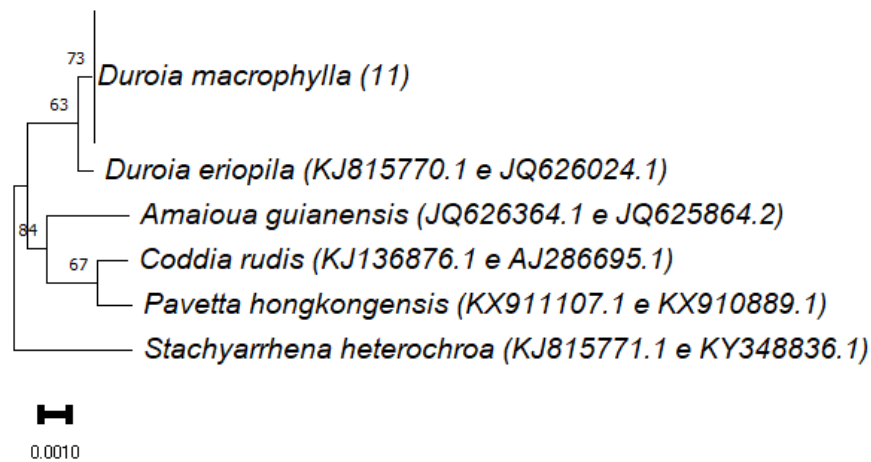


Figura 6 - Árvore de distância genética *Neighbor-Joining* (NJ) com espécimes de *Duroia macrophylla* e de cinco espécies que apresentaram maiores níveis de similaridade genética com a mesma a partir da busca no BlastN-NCBI com os marcadores *matK* e *rbcL* concatenados. Valores de suporte de *bootstrap* entre 63 e 84.

### 3.3.2.2 BoldSystems

#### 3.3.2.2.1 *matK*

Os 15 espécimes de *D. macrophylla* constituíram um subgrupo e *D. eriopila* outro, ambos com altos valores de *bootstrap* (97 e 98, respectivamente). O gênero *Duroia*, está em um grupo separado das demais espécies que apresentaram maiores níveis de similaridade com *D. macrophylla*. Devido aos baixos valores de suporte de *bootstrap* no agrupamento das outras espécies, verifica-se que a posição de *Aulacocalyx jasminiflora* está aparentemente indefinida entre os grupos, enquanto que *Pleiocoryne fernandensis* e *Mitriostigma axillare* formam um subgrupo. A espécie *Vallesia antillana* ficou mais distante geneticamente das espécies amostradas (Figura 7).

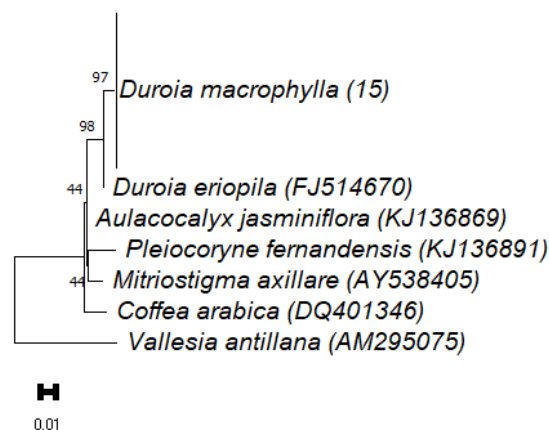


Figura 7 - Árvore de distância genética *Neighbor-Joining* (NJ) com espécimes de *Duroia macrophylla*, e de *D. eriopila* e das cinco espécies que apresentaram maiores níveis de similaridade genética com *D. macrophylla* a partir da busca no BoldSystems com o marcador *matK*. Valores de *bootstrap* entre 44 e 98.

### 3.3.2.2.2 *rbcL*

As sequências nucleotídicas de *rbcL* permitiu recuperar uma árvore de distância na qual um dos agrupamentos reúnem as espécies pertencentes ao gênero *Duroia*, no qual *D. hirsuta* e *D. longiflora* estão geneticamente próximas. A espécie *D. aquatica* está mais próxima geneticamente dos 11 espécimes de *D. macrophylla*. As cinco espécies com maiores percentuais de similaridade com *D. macrophylla* se agruparam de forma que as espécies *Rothmannia capensis*, *Hyperacanthus amoenus* e *Catunaregam spinosa* constituísse um outro clado (Figura 8).

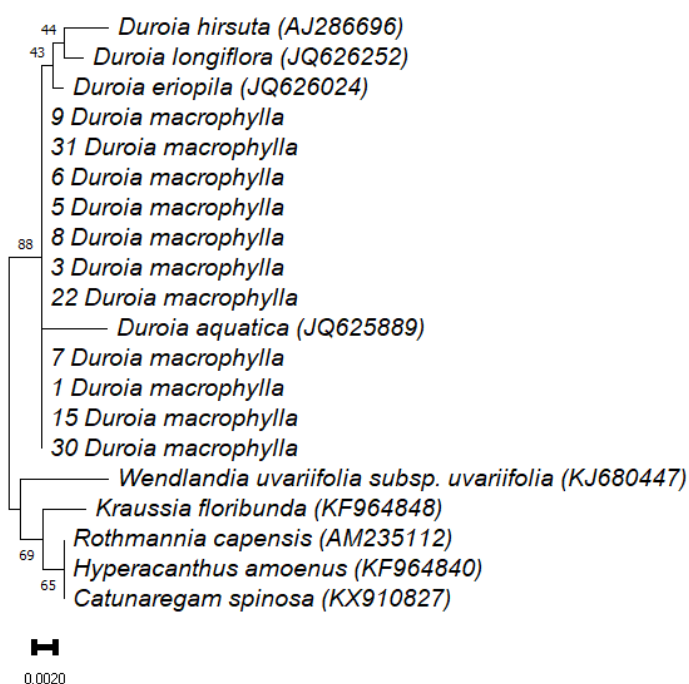


Figura 8 - Árvore de distância genética *Neighbor-Joining* (NJ) com espécimes de *Duroia macrophylla* e quatro espécies cogenéricas (*D. aquatica*, *D. eriopila*, *D. hirsuta* e *D. longiflora*) e das cinco espécies que apresentaram maiores níveis de similaridade genética com *D. macrophylla* a partir da busca no BoldSystems com o marcador *rbcL*. Valores de suporte de *bootstrap* entre 43 e 88.

## 4. Discussão

O tamanho do fragmento recuperado de regiões codificadoras e não codificadoras concatenadas do genoma cloroplastidial representam cerca de 5% de um genoma cloroplastidial completo, levando em consideração o genoma do café (Mekbib et al. 2020).

Em um estudo que envolveu o uso de quatro marcadores moleculares considerados *barcodes* na identificação de *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae), comumente chamada de piri-piri, foram recuperados 469 pb para o *rbcL*, 623 pb para o *matK*, 556 pb para *psbA-trnH* e 575 pb para o ITS (Mezzasalma et al. 2017). Ao contrário do que foi verificado neste trabalho, os autores também encontraram *indels* nas sequências de *psbA-trnH* e ITS, por isso ocorreu

variação de tamanho. Neste trabalho, o tamanho dos fragmentos recuperados para os marcadores citados anteriormente foi superior, com exceção do *psbA-trnH* (Tabela 4).

O tamanho dos fragmentos obtidos para os nove marcadores não codificadores desenvolvidos por Shaw (Shaw et al. 2005, 2007) foi menor do que o tamanho esperado, com exceção do marcador O, para o qual era esperado 622 pb e foram recuperados 631 pb. Contudo, apesar da inferioridade destes valores, a maioria (C, O, P, Q e T3) encontra-se dentro da variação do tamanho esperado (Tabela 10).

Tabela 10 - Tamanho dos fragmentos em pares de base obtidos para os nove marcadores não codificadores de Shaw et al. (2007), com seus respectivos tamanhos esperados e suas variações.

Marcador	Tamanho do fragmento obtido (pb)	Tamanho do fragmento esperado (pb)	Varição do tamanho do fragmento esperado (pb)
C	640	763	619 a 1035
L	506	1049	981 a 1077
M	469	1109	892 a 1315
N	555	1040	734 a 1261
O	631	622	320 a 784
P	632	1146	318 a 1800
Q	627	655	238 a 791
T3	534	786	529-1008
U	465	1090	968 a 1160

Nos trabalhos de Shaw et al. (2005, 2007) essas regiões apresentaram altos níveis de variação, possibilitando a aplicação em estudos de sistemática vegetal, genética populacional e comunidades filogeográficas. Este resultado foi diferente do encontrado para *D. macrophylla*. Em contrapartida, foram encontrados *indels* na região do marcador T3 em *Gratiola* (Scrophulariaceae), dados que corroboram com o que foi verificado neste estudo.

Na análise de diversidade de regiões do cloroplasto de 57 amostras de *Ranunculus acris* (Ranunculaceae) foi verificado que esse marcador apresenta 15 sítios polimórficos, representados por substituições e *indels*, que resultaram em cinco sequências diferentes (Lange et al. 2018). O N é um espaçador intergênico que está entre os mais variáveis, em termos de porcentagem de variabilidade, contudo essa região é curta e pode não fornecer conteúdos de polimorfismo informativo suficiente para distinguir espécies altamente relacionadas (Shaw et al. 2007).

O marcador T3 foi utilizado para verificar se a variação genética no nível intraespecífico de uma espécie de *Cereus* Mill. (Cactaceae) prevê a variação em outra intimamente relacionada. Para as duas espécies foram utilizados cinco espécimes, para as quais foi detectado um



haplótipo e a diversidade nucleotídica igual a zero, uma vez que não foram verificadas substituições de nucleotídeos e *indels* no nível intraespecífico (Silva et al. 2016).

O monomorfismo encontrado em *psbA-trnH* pode ser explicado devido a essa região ser pequena e por isso não possibilitar caracteres potencialmente informativos (PICs). De maneira geral, a variação de nucleotídeos nesse marcador é alta, mas foram encontradas regiões conservadas entre grupos taxonômicos altamente divergentes. Foram verificadas pequenas regiões de seis a 30 pb conservadas dentro das angiospermas, o que limita seu potencial para inferências filogenéticas dentro de táxons altamente divergentes (Štorchová e Olson 2007).

A baixa taxa de evolução molecular no gene *rbcL* limita sua utilidade para distinguir espécies relacionadas, este gene tem um papel essencial na fotossíntese e está sob forte seleção purificadora em plantas autotróficas, como é o caso de *D. macrophylla* (Braukmann et al. 2017).

O *rps16* íntron apresentou polimorfismo no nível intergenérico, intra e interespecífico para espécies de *Allium* (Amaryllidaceae) (Ryzhova et al. 2009). Sendo assim, os marcadores cloroplastidiais fornecem uma importante ferramenta para o estudo de hibridização e introgressão neste grupo, uma vez que são herdados de uma das linhagens parentais e não são afetados pela recombinação (van Raamsdonk et al. 2003).

A grande maioria dos polimorfismos observados no DNA do cloroplasto consiste em variações de comprimento resultantes de pequenas inserções e deleções (*indels*) as quais envolvem sequências de 1 a 10 pb localizadas em regiões não codificantes do genoma (Palmer 1987).

As regiões não codificadoras do DNACp são comumente utilizadas como marcadores moleculares em estudos de filogenia de plantas fornecendo polimorfismos adequados para estabelecer relações filogenéticas entre espécies e gêneros intimamente relacionados (Spalik et al. 2009). Ressalta-se ainda que o DNACp apresenta um conteúdo gênico extremamente conservado mesmo entre espécies filogeneticamente distantes (Downie e Palmer 1992).

Os marcadores moleculares nucleares são mais prováveis de terem polimorfismos suficientes para serem analisados em nível intraespecífico (Li et al. 2011) devido a sua alta taxa de substituição de nucleotídeos, o que permite comparações no qual poucos genes forneceram caracteres suficientes para análises neste nível (Mezzasalma et al. 2017).

Um fator que pode resultar nessas altas taxas de polimorfismo é que esses marcadores apresentam herança biparental e são transportados tanto via pólen quanto via semente, enquanto que o cloroplastidial é herdado maternalmente e é transportado apenas via semente (Ouborg et al. 1999).

Contudo, já foi relatado monomorfismo intraespecífico em sequências de ITS para espécies *Passiflora pohlii*, *P. urubiciensis*, *P. jilekii*, *P. miersii* e *P. sidaefolia*. Esse marcador foi utilizado para avaliar padrões gerais de variação intra e interespecífica em espécies representativas dos quatro subgêneros de *Passiflora* (Mäder et al. 2010).

Mezzasalma et al. (2017) utilizaram marcadores do cloroplasto na identificação de espécimes de *Cyperus* (piri-piri). E a partir de seus resultados, afirmam que os *barcodes rbcL* e *matK* apresentam baixo polimorfismo e não são adequados para distinguir espécies deste gênero, diferentemente do que foi observado com os marcadores ITS e *psbA-trnH*.

Entre as sequências de ITS de *D. macrophylla* não foram encontrados *indels*, porém foram observadas duas transições e duas transversões. Em um estudo realizado com sequências desse marcador em *Passiflora*, o número de substituições de nucleotídeos foi maior de que os *indels*, os quais variaram de zero a 104. Ainda, o índice de diversidade nucleotídica intraespecífica variou de zero a 0,022 para as 23 espécies avaliadas, e a interespecífica foi de 0,002 para sete espécies pertencentes ao subgênero *Decaloba* (Mäder et al. 2010).

Bolson et al. (2015) utilizaram regiões do DNACp e o ITS na identificação espécies arbóreas da Floresta de araucárias. Os índices de diversidade genética foram superiores para os marcadores *rbcL*, *matK* e ITS do que os obtidos neste estudo no nível interespecífico (Tabela 5), possivelmente, devido a diferença na quantidade de espécies utilizadas. Enquanto neste estudo foram analisadas duas espécies de mesmo gênero (*Duroia*) para o *matK*, cinco para *rbcL* e quatro para o marcador ITS, naquele foram utilizados diferentes gêneros nas quantidades de 65, 68 e 80, respectivamente.

Todavia, em um estudo realizado com a espécie *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) (Luz 2019), foram avaliadas 16 sequências de ITS, que apresentaram valores dos índices de diversidade genética superiores aos relatados neste estudo. Enquanto que a diversidade nucleotídica para o *rbcL* e *matK* (0,0008 e 0,0004, respectivamente) se mostraram inferiores ao que foi encontrado neste trabalho (Tabela 5). O valor referente ao *rbcL* é inferior ao valor estimado no nível interespecífico, com cinco espécies de *Duroia*.

O maior valor de distância genética no nível intraespecífico entre os espécimes de *D. macrophylla* (0,007%) foi mais baixo de que os valores encontrados em *Passiflora foetida* (Passifloraceae) com valor de 0,044% (Mäder et al. 2010) e em *Banisteriopsis caapi* de 0,015% (Luz 2019). Entretanto é maior de que a distância intragrupo de *Cyperus* que apresentou valor igual a 0,005% (Mezzasalma et al. 2017).

No nível interespecífico, o valor da distância genética foi maior entre *D. hirsuta* e *D. macrophylla* (0,080%), seguida do valor entre *D. aquatica* e *D. macrophylla* (0,031%), e entre *D. eriopila* e *D. macrophylla* (0,024%). Em espécies de *Cyperus*, esses valores apresentaram variação de 0,027 a 0,047% (Mezzasalma et al. 2017) e para espécies do subgênero *Passiflora* de zero a 0,171 (Mäder et al. 2010), neste último, os autores consideram que o ITS é um marcador promissor para avaliar a variabilidade intraespecífica em espécies desse gênero.

De acordo com Persson (2000), o gênero *Duroia* possui relação mais próxima ao gênero *Amaioua* do que ao *Stachyarrhena* utilizando o marcador ITS, esses resultados corroboram com o que foi encontrado com o marcadores *matK* e *rbcL* concatenados (Figura 6). Em outro estudo, no qual foram utilizados cinco marcadores do DNACp incluindo o *rbcL* em análise Bayesiana, relatam que o gênero *Duroia* está incluso no mesmo grupo que *Stachyarrhena* e *Amaioua*, enquanto que *Coddia* e *Pavetta* pertencem a outros dois grupos distintos (Mouly et al. 2014).

Estudos prévios mostram que a combinação de marcadores plastidiais pode ser mais eficiente do que quando são utilizados marcadores isolados (CBOL 2009). Contudo, Bolson et al. (2015) relatam que a combinação do ITS com o *psbA-trnH* indica melhores resultados na performance como *barcodes*, comparada ao desempenho do *rbcL* e o *matK* separados e combinados. Neste trabalho, o ITS e o *matK* apresentaram melhores resultados (Figuras 3 e 4, respectivamente), quando comparados ao *rbcL*, pois as sequências de *D. macrophylla* se organizaram em um grupo diferente das demais espécies de *Duroia*. Com o *rbcL* (Figura 5), *D. aquatica* constituiu o mesmo grupo de *D. macrophylla*, o que pode sugerir uma baixa performance do marcador como *barcode* com o algoritmo utilizado (NJ).

Na reconstrução filogenética do complexo das tribos que compõem a família Rubiaceae foram utilizados cinco marcadores cloroplastidiais e inferência Bayesiana (Mouly et al. 2014). Neste trabalho, a árvore de distância gerada com sequências de *matK* no nível intergenérico (Figura 7) mostram que as espécies *Aulacocalyx jasminiflora* e *Pleiocoryne fernandensis* são mais próximas ao gênero *Duroia* do que a *Coffea arabica*, dados que corroboram com o trabalho citado.

Ainda no estudo em questão, é proposto que o gênero *Duroia* se inclua na tribo Cordiereae, e as espécies *Rothmannia capensis*, *Hyperacanthus amoenus* e *Catunaregam spinosa* na tribo Gardenieae. Dessa forma, os resultados encontrados com *rbcL* no nível intergenérico (Figura 8) apontam que *Wendlandia* e *Kraussia floribunda* compõem um grupo mais distante do que a tribo Gardenieae em relação a Cordieareae.

Podem ser destacadas algumas possíveis causas para o monomorfismo detectado em 11 dos 14 marcadores estudados, como: as atuações da seleção natural e deriva genética (Alves 2005) que se tornam mais impactantes em populações pequenas, como é o caso de *D. macrophylla*, já que a espécie apresenta baixa abundância no local em que foi coletada e ainda que, o banco de dados é proveniente de espécimes oriundos de uma localidade (Reserva Ducke). Vale ressaltar que não há relatos na literatura sobre a biologia reprodutiva da espécie.

A probabilidade da espécie *D. macrophylla* apresentar problemas em relação a sua conservação em um ambiente natural pode ser maior quando são verificadas características monomórficas, visto que, ao ser exposta a patógenos, predadores ou mudanças ambientais, a escassez da variação genética pode não permitir que alguns espécimes superem estas ocasiões (Cole e Biesboer 1992).

Os marcadores que poderiam ser utilizados em estudos populacionais com *D. macrophylla* seriam os cloroplastidiais N e T3, e principalmente o nuclear ITS, devido às taxas de polimorfismos que apresentaram. Contudo, torna-se interessante a busca por outros marcadores baseados em sequência de DNA, como por exemplo os marcadores anônimos, os quais apresentaram níveis de variação adequados para estas análises em *Banisteriopsis caapi* (Luz 2019). E além disso, o desenvolvimento de marcadores codominantes, como exemplo os microssatélites, que são um dos marcadores mais utilizados em estudos de genética populacional em espécies vegetais.

## Capítulo III

---

Silva, J.N.; Marques, G.M.G.; Formiga, K.M.; Ramos, S.L.F.; Nunez, C.V.; Batista, J.S. 2022. Marcadores de DNA para *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae): Isolamento e caracterização de locos microssatélites de uma frutífera amazônica de importância biotecnológica. Manuscrito formatado para *Acta Amazonica*.

## Resumo

*Duroia macrophylla* (Rubiaceae) produz substâncias com potencial bioativo, característica que torna importante o conhecimento sobre a variabilidade e estrutura genética, fluxo gênico e sistema reprodutivo da espécie. Para o alcance dessas informações, os marcadores moleculares microssatélites são um dos marcadores mais adequados pois apresentam altas taxas de polimorfismo. Com isso, foi realizado o isolamento e caracterização de locos microssatélites de *D. macrophylla*, a partir de uma biblioteca genômica enriquecida. Foram obtidas 93 sequências de boa qualidade de clones recombinantes, as quais geraram 32 contigs com 36 microssatélites. O motivo de repetição mais frequente entre os microssatélites foi do tipo dinucleotídeo (80,6%) e quanto à natureza de repetição, o mais frequente foi do tipo perfeito (91,7%). Foram desenhados 30 pares de *primers* e caracterizados 24 locos microssatélites (22 polimórficos e 2 monomórficos) em 23 a 36 espécimes. O número de alelos variou de um a nove, com um total de 118. A heterozigosidade observada e esperada variou de 0,143 a 0,844 e 0,135 a 0,837, respectivamente. Seis locos não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação não foi detectado em nenhum dos locos. O coeficiente de endogamia variou de -0,413 a 0,555 e o conteúdo de polimorfismo informativo entre 0,124 a 0,803. Os microssatélites desenvolvidos oferecem possibilidade de amplificação heteróloga e poderão ser utilizados em estudos de variabilidade genética da espécie, devido às taxas de polimorfismo que apresentaram. E a partir desses estudos, podem ser fornecidas informações para subsidiar políticas de conservação e manejo para a espécie.

Palavras-chave: apuruí, SSR, Amazônia, marcador molecular.

## 1. Introdução

Os distúrbios naturais são importantes na dinâmica das vegetações dos biomas, através do processo de sucessão ecológica. No entanto, com o atual contexto de aquecimento global, podem ser esperadas mudanças no regime de perturbação e como consequências, muitas vezes consideradas destrutivas em termos de habitat, ocorre a “perda de biodiversidade” (Cours et al. 2021).

Evolutivamente as plantas desenvolveram formas de se adaptar a diferentes mudanças naturais (Futuyma 1992) e uma destas é sua própria variabilidade genética que atua tanto na adaptação das espécies a ambientes dinâmicos, quanto em sua capacidade de dispersão e interações ecológicas (Soberón 2007).

Por outro lado, é de grande importância que haja a proteção de um dos ecossistemas mais ricos em biodiversidade - a floresta amazônica - por todos os serviços ambientais que ela brinda e pelas populações tradicionais que a habitam (Zampieri e Pau 2022). Uma das formas de proteção é através de políticas públicas de conservação da biodiversidade tropical e da realização de manejo sustentável dos produtos florestais não madeireiros (PFNMs), uma alternativa de desenvolvimento social e econômico para populações locais e comunidades indígenas (Ramos et al. 2018).

Dentro do PFNM são identificadas diferentes espécies com alta importância de utilidade para o homem, como exemplo, a *Duroia macrophylla* que produz grande quantidade de compostos secundários com atividades biológicas, dentre as atividades biológicas testadas, foram registradas: atividade antitumoral (Nunez e Vasconcelos 2012), antituberculose (Martins et al. 2014a), antioxidante, inseticida e citotóxica (Martins et al. 2014b), antibacteriana (Martins 2014) e antiangiogênica (Carvalho et al. 2021).

Levando em consideração a importância medicinal que esta espécie pode apresentar, tanto no âmbito científico quanto social, torna-se importante verificar o índice de variabilidade e estruturação genética, que são fatores que estão relacionados à adaptação e sobrevivência da espécie em determinada localidade (Hamrick 1982).

Os microssatélites desenvolvidos para *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. (Rubiaceae) representam ferramentas informativas para análise filogeográfica e populacional da espécie e contribuirão para uma melhor compreensão da história biogeográfica do Cerrado e, conseqüentemente, da conservação deste bioma ameaçado (Dantas et al. 2019). Os primeiros SSR's desenvolvidos para *Gardenia jasminoides* J. Ellis. (Rubiaceae) apresentam potencial para aplicação em estudos de diversidade genética, estrutura populacional, identificação de

cultivares e evolução, que são fatores importantes já que se trata de uma planta com importância medicinal (Deng et al. 2015).

O estudo sobre a diversidade genética das espécies possibilita resultados vantajosos para o melhoramento genético, principalmente de espécies com importância econômica (Kirouani et al. 2018, Das et al. 2022, Duan et al. 2022, Gore et al. 2022), e para a conservação de espécies vegetais, estejam estas em risco de extinção ou não (Melo 2016, Cristóbal-Pérez et al. 2022).

No intuito de acessar a variabilidade genética de *D. macrophylla*, e por conseguinte, informações biológicas cruciais sobre a espécie, tais como: sistema reprodutivo, estrutura genética, fluxo gênico, dentre outras, este trabalho teve o objetivo de isolar e caracterizar marcadores microssatélites para *D. macrophylla*, a fim de disponibilizar pioneiramente marcadores moleculares codominantes para uma frutífera amazônica de importância biotecnológica.

## **2. Material e métodos**

Foram coletadas folhas de 36 espécimes de *D. macrophylla* na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada na cidade de Manaus, Amazonas, (SISGEN AE23A4A) e a exsicata de um dos espécimes foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com o número: 291916. O material vegetal foi armazenado a -20 °C em saco plástico tipo *zip lock* contendo sílica gel no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LTBM- INPA) até o início das etapas moleculares.

A extração de DNA genômico dos espécimes coletados foi realizada de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1990) com modificações realizadas no tratamento 6 (Silva et al in prep, Capítulo I). A concentração do DNA foi estimada em gel de agarose 0,8% com o marcador de peso molecular *fago lambda* (Hoehne 1939).

A biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites foi construída de acordo com a metodologia descrita por Billotte et al. (1999), a partir do DNA genômico (DNA) de um espécime de *D. macrophylla* coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke. O DNA ( $\approx 100$  ng/ $\mu$ L) foi digerido com enzima de restrição *RSA I* e ligado a adaptadores (*RSA21* e *RSA25*) com T4 DNA ligase, em seguida o produto foi pré-amplificado e purificado com seguindo o método salino com PEG 8000 (polietilenoglicol) (Lis e Schleif 1975). Os fragmentos de DNA digeridos foram selecionados por hibridização, utilizando sondas (CT)<sub>8</sub> e (GT)<sub>8</sub> marcadas com biotina e esferas magnéticas recobertas por estreptavidina. Foi realizada uma amplificação por



PCR, e após isso, os fragmentos selecionados foram ligados no vetor pGEM-T easy (Promega) e a transformação bacteriana foi realizada por eletroporação em células competentes XL1-*blue* de *Escherichia coli*, seguida da inoculação em meio contendo IPTG, X-GAL e meio sólido Luria Bertani (LB) com ampicilina (100 mg/mL) e incubados entre 18 a 22 horas a 37 °C. As colônias brancas individuais foram transferidas e incubadas a 37 °C em placas contendo meio LB líquido, para manutenção dos clones recombinantes, que foram amplificados com os *primers* T7 e SP6.

O produto de PCR foi purificado com o método salino com PEG 8000 (Lis e Schleif 1975) e em seguida os clones recombinantes foram sequenciados utilizando o kit BigDye Terminator Ver 3.1 (Thermo Fisher Scientific), tampão 5X e os *primers* T7 e SP6 em reação bidirecional, seguida de precipitação com etanol e EDTA e eluída em formamida Hi-Di (Thermo Fisher Scientific), seguindo a recomendação do fabricante. Em seguida, o produto da reação foi injetado em analisador automático de DNA (*ABI 3130xl* – Thermo Fisher Scientific).

As sequências nucleotídicas foram analisadas, editadas e alinhadas com o auxílio dos programas, *CHROMAS* 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd) e *BIOEDIT* 7.2.5 (Hall 1999), neste último ainda foi realizada a organização para a formação dos *contigs* e a verificação de redundância. As sequências de DNA dos insertos de melhor qualidade foram selecionadas e identificadas as regiões com microssatélites com o auxílio do programa *WEBSAT* (Martins et al. 2009). A seleção dessas sequências atendeu aos seguintes critérios: cinco ou mais repetições com o motivo de repetição de dinucleotídeo, mínimo de quatro repetições do tipo trinucleotídeo e três repetições para microssatélites do tipo tetra, penta e hexanucleotídeo.

Outras estimativas foram calculadas para a caracterização da biblioteca genômica tais como: número de clones com microssatélites, número total de microssatélites presentes na biblioteca, número de microssatélites para cada de motivo de repetição - considerando também os nucleotídeos que os compõem, número de microssatélites perfeitos, imperfeitos e interrompidos e o número de clones com microssatélites selecionados para o desenho de *primers*.

Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *WEBSAT* (Martins et al. 2009). Os critérios utilizados para o desenho foram: tamanho do *primer* entre 17 e 23 pb, temperatura de anelamento entre 55 e 65 °C, conteúdo de guanina-citosina (GC) entre 40 e 60% e tamanho dos fragmentos que contêm os microssatélites entre 100 e 350 pares de base de tamanho. Em cada *primer forward* desenhado foi adicionado uma sequência nucleotídica

universal (cauda de M13) na extremidade 5' para permitir a marcação por fluorescência e uso posterior do método econômico de genotipagem, descrito por Schuelke (2000).

Os fragmentos de DNA genômico de 23 a 36 espécies foram amplificados por PCR em termociclador (Veriti® *Thermal Cycler* – ThermoFisher) utilizando os *primers* desenhados. A reação ocorreu em um volume final de 10 µL, sendo 5 µL de Master Mix [1 µL de dNTP (1 µM); 0,3 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 µM); 2 µL de T10X e 1,7 µL de água ultrapura], 1 µL de *primer forward* (4 µM), 1 µL de *primer reverse* (4 µM), 0,5 µL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 5 mg/mL, 0,2 µL Taq DNA polimerase (5 U/µL), 1,3 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA. O perfil de amplificação foi o seguinte: [68 °C-2 min, 92 °C-30 s, 30x (92 °C- 30s, temperatura de anelamento- 35 s, 68°C- 35s), 25x (92 °C- 20 s, 53 °C- 30 s, 72 °C- 30s); 72 °C- 15 min; 68 °C-15 min]. A temperatura de anelamento foi padronizada para cada iniciador (Tabela 1). Em seguida, o produto dessa amplificação foi analisado em eletroforese em gel de agarose, utilizando marcador 1kb *plus* (Promega) como referência para os tamanhos dos fragmentos gerados e visualizados em fotodocumentador.

As PCRs foram submetidas à eletroforese capilar em Analisador de DNA (*ABI 3130xl* - Thermo Fisher) em sistema multiplex de forma que pelo menos dois locos de cada amostra fossem genotipados simultaneamente. Foi utilizado 1 uL do produto de PCR diluído, adicionado a 7,9 µL de solução contendo *Tween 20* a 0,1% + 0,1 µL do padrão de peso molecular GeneScan™500 ROX™ (Thermo Fisher Scientific).

As genotipagens foram analisadas e os alelos e genótipos definidos com o auxílio do programa GENEMARKER V2.6.4 (SoftGenetics). Os alelos nulos, *dropout* e *stutters*, foram checados com auxílio do programa *MICROCHECKER* (Oosterhout et al. 2004). O intervalo do tamanho dos alelos, a heterozigosidade observada ( $H_O$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e o conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) foram verificados com auxílio do programa MsTools (Park 2001). As estatísticas descritivas ( $F_{IS}$ ), desequilíbrio de ligação e número de alelos foram inferidos pelo programa *FSTAT* v2. 9.3.2 (Goudet 2002). O desvio do EHW foi verificado pelo programa *GENEPOP* v4 (Raymond e Rousset 1995) e considerado o nível de significância [ $P (5\%) \leq 0,002$ ] após a correção de Bonferroni (Rice 1989).

### 3. Resultados

A biblioteca genômica foi construída a partir de 96 sequências de clones recombinantes sendo que 93 apresentaram boa qualidade (96,8%). Dentre essas, 32 sequências continham microssatélites (34,4%). Foram geradas 32 sequências não redundantes (*contigs*) com 36

microsatélites e 30 pares de *primers* desenhados. Os microsatélites foram caracterizados quanto ao motivo de repetição (Figura 1) com a predominância de dinucleotídeos (29) e quanto à natureza de repetição, o maior percentual foi do tipo perfeito com 91,7% (33) (Figura 2). Entre os microsatélites dinucleotídeos o mais frequente foi do tipo AG (26,7%), seguido de GA e CT (20%, cada) (Figura 3).

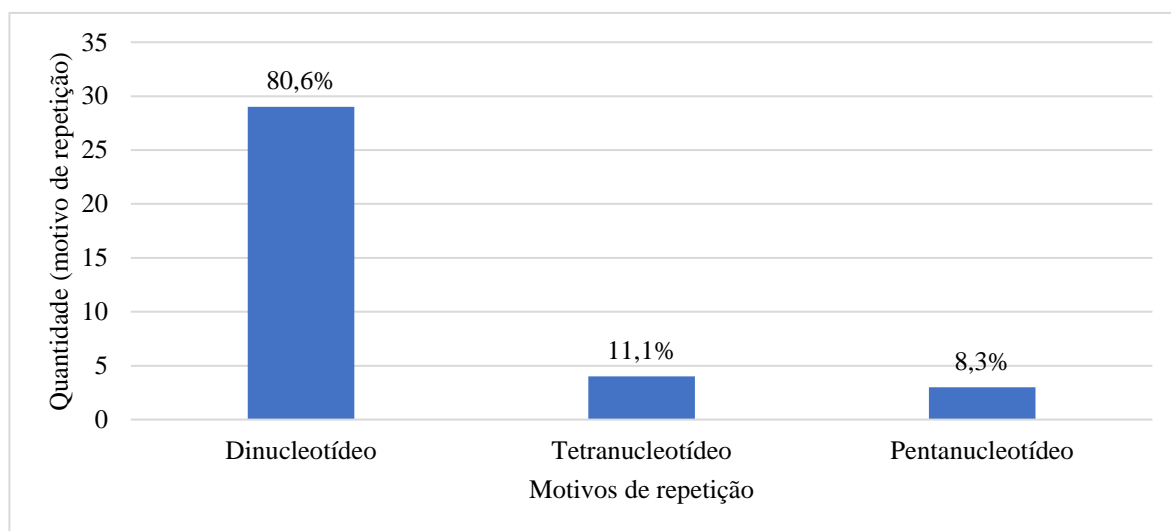


Figura 1- Caracterização de 30 locos microsatélites de *Duroia macrophylla* quanto ao motivo de repetição.

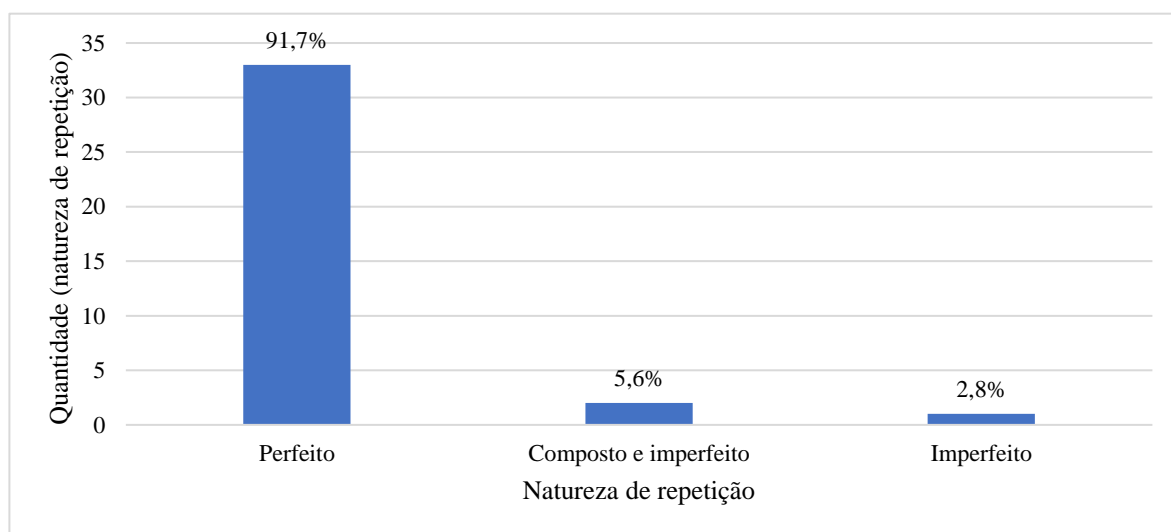


Figura 2 - Caracterização de 30 locos microsatélites de *Duroia macrophylla* quanto à natureza de repetição.

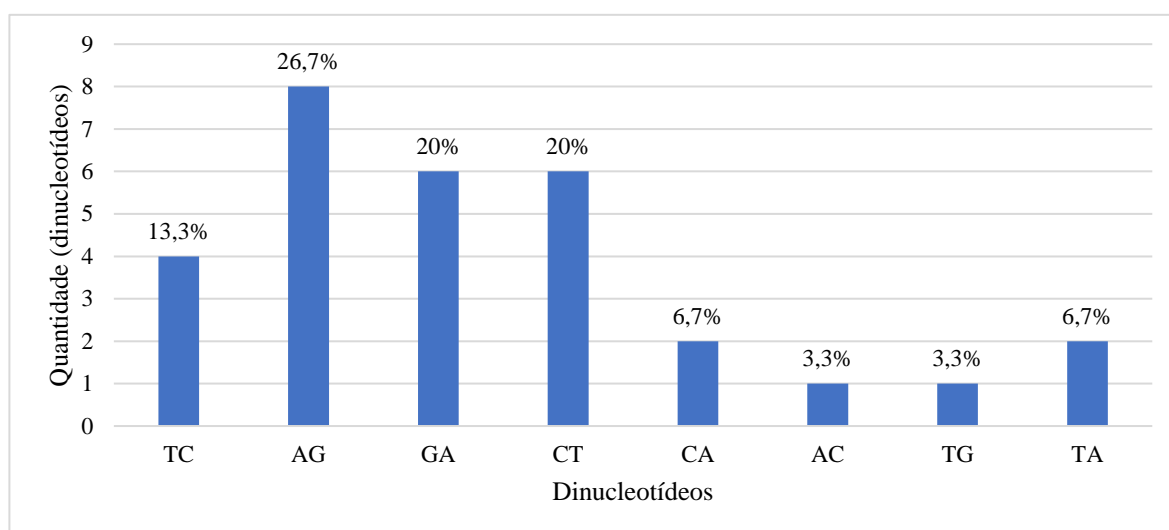


Figura 3 - Motivo de repetição do tipo dinucleotídeo mais frequente encontrado nos microssatélites de *Duroia macrophylla*.

Foram caracterizados 24 locos microssatélites em 23 a 36 espécimes de *D. macrophylla* (Tabela 1), cuja temperatura de anelamento variou entre 60 a 65 °C.

O número de alelos variou entre um (Dma21 e Dma23) a nove (Dma7, Dma8, Dma13, Dma26), com um total de 118 e média de 4,68 alelos por loco, com tamanho variando entre 144 (Dma7) e 361 (Dma21) com tamanho médio de 254.

A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) variou de 0,143 (Dma25) a 0,844 (Dma26) com média de 0,546, enquanto que a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) variou de 0,135 (Dma25) a 0,837 (Dma26) com média 0,582. Dois locos apresentaram alelos nulos (Dma8 e Dma22), um apresentou *stutters* (Dma22) e nenhum dos locos apresentou *dropout*.

Seis locos (Dma5, Dma8, Dma9, Dma16, Dma22, Dma28) não apresentaram HWE após a correção de Bonferroni [ $P (5\%) \leq 0,002$ ] (Rice 1989).

Não foi verificado desequilíbrio de ligação em nenhum dos locos, os valores do  $F_{IS}$  variaram de -0,413 (Dma28) a 0,555 (Dma22) e média de 0,049. O PIC variou entre 0,124 (Dma25) a 0,803 (Dma26) e apresentou média de 0,524.

Tabela 1 - Caracterização de 24 locos microssatélites em 23-36 espécimes desenvolvidos para *Duroia macrophylla* coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-AM.

Locos SSR	Motivo de repetição	Fluorescência	Ta (°C)	Tamanho (pb)	N	A	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	P-HWE	F <sub>IS</sub>	PIC
Dma2	(AG) <sub>11</sub>	FAM	63	190-208	25	5	0,480	0,624	0,0597	0,235	0,563
Dma3	(AG) <sub>17</sub>	FAM	60	145-165	34	7	0,824	0,729	0,7955	-0,132	0,695
Dma4	(AG) <sub>16</sub>	FAM	60	306-332	31	6	0,548	0,579	0,3111	0,053	0,541
Dma5	(GA) <sub>17</sub>	FAM	63	238-254	27	8	0,667	0,780	0,0000*	0,148	0,736
Dma6	(AG) <sub>16</sub>	FAM	62	198-210	23	7	0,609	0,739	0,1358	0,180	0,692
Dma7	(AG) <sub>17</sub>	HEX	62	144-174	26	9	0,692	0,775	0,0360	0,108	0,735
Dma8	(CT) <sub>14</sub>	HEX	60	248-302	32	9 <sup>a</sup>	0,375	0,657	0,0000*	0,433	0,614
Dma9	(AG) <sub>14</sub>	FAM	60	224-250	35	6	0,629	0,566	0,0000*	-0,113	0,508
Dma10	(GA) <sub>12</sub>	NED	60	156-178	35	5	0,829	0,670	0,0120	-0,240	0,612
Dma11	(AG) <sub>8</sub>	FAM	61	177-179	33	2	0,485	0,373	0,1526	-0,306	0,300
Dma12	(CT) <sub>12</sub>	FAM	60	274-280	34	4	0,647	0,573	0,1677	-0,131	0,481
Dma13	(GA) <sub>11</sub>	HEX	60	168-194	32	9	0,625	0,750	0,0250	0,169	0,718
Dma15	(TC) <sub>9</sub>	HEX	60	234-246	33	4	0,697	0,621	0,0460	-0,125	0,546
Dma16	(TC) <sub>9</sub> tt(TC) <sub>5</sub>	HEX	60	204-238	36	4	0,556	0,621	0,0006*	0,107	0,547
Dma20	(CT) <sub>8</sub>	NED	60	266-272	35	3	0,343	0,422	0,4488	0,190	0,341
Dma21	(GA) <sub>8</sub>	HEX	65	361	26	1	-	-	-	-	-
Dma22	(GA) <sub>6</sub>	HEX	60	294-306	30	6 <sup>a</sup>	0,300	0,668	0,0000*	0,555	0,609
Dma23	(CA) <sub>5</sub>	HEX	62	232	31	1	-	-	-	-	-
Dma25	(CA) <sub>9</sub>	NED	60	265-267	35	2	0,143	0,135	1,0000	-0,063	0,124
Dma26	(TG) <sub>14</sub>	NED	63	304-320	32	9	0,844	0,837	0,4951	-0,008	0,803
Dma27	(GACAC) <sub>3</sub>	FAM	60	295-300	35	2	0,371	0,307	0,5702	-0,214	0,257
Dma28	(TA) <sub>6</sub>	NED	60	218-244	36	5	0,778	0,554	0,0000*	-0,413	0,468
Dma29	(TTTA) <sub>3</sub>	NED	60	224-228	35	2	0,229	0,358	0,0472	0,364	0,290
Dma30	(TATG) <sub>3</sub> t(TATGT) <sub>2</sub>	NED	60	318-328	35	2	0,343	0,487	0,0884	0,299	0,365

Legenda: Ta: Temperatura de anelamento; pb: pares de bases; N: número de espécimes analisados; A: número de alelos; a: presença de alelo nulo; H<sub>O</sub>: Heterozigosidade observada; H<sub>E</sub>: Heterozigosidade esperada; P-HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni; F<sub>IS</sub>: Coeficiente de endogamia; PIC: conteúdo de polimorfismo informativo.

#### 4. Discussão

Até o momento não há marcadores microssatélites desenvolvidos para outras espécies pertencentes ao gênero *Duroia*, contudo já foram desenvolvidos para *Alibertia edulis* (Rubiaceae), espécie geneticamente próxima a *Duroia* e para outras espécies pertencentes a esta família (Tabela 2). Em *A. edulis*, foram levados em consideração, diferentemente deste estudo, os mononucleotídeos, que apareceram com uma frequência de 57,1%, seguido de 30,9% de dinucleotídeos (Dantas et al. 2019). Enquanto que em *Genipa americana* (Rubiaceae) o motivo mais frequente foi do tipo dinucleotídeo com 80,9% (Manoel et al. 2014).

O efeito de deriva genética e a presença de alelos nulos em dois locos (Dma8 e Dma22) podem ter ocasionado desvio significativo para HWE em seis locos microssatélites. Não foi verificado desequilíbrio de ligação entre os locos de *D. macrophylla*, enquanto que em *G. americana*, todos os 17 locos polimórficos desenvolvidos estavam em desequilíbrio de ligação. Segundo os autores esse fato pode ser explicado provavelmente devido à deriva genética causada pela fragmentação florestal (Manoel et al. 2014).

Com base nos valores da escala de conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) (Botstein et al. 1980), os valores acima de 0,5 indicam locos altamente informativos, entre 0,25 e 0,50 moderadamente informativo e menores de que 0,25, baixo ou não informativo. Entre os 22 locos polimórficos, 95,5% mostraram-se acima de 0,25 sendo que 63,6% dos locos foram altamente informativos (Dma2, Dma3, Dma4, Dma5, Dma6, Dma7, Dma8, Dma9, Dma10, Dma13, Dma15, Dma16, Dma22 e Dma26) e 31,8% moderadamente informativos (Dma11, Dma12, Dma20, Dma27, Dma28, Dma29 e Dma30).

Dessa forma, foram desenvolvidos pela primeira vez marcadores moleculares codominantes (locos microssatélites) para *D. macrophylla*. Esses locos demonstraram ser promissores para estudos que visam estimar a variabilidade genética, verificar estruturação genética em populações da espécie, entre outras aplicações.

Levando em consideração a ausência de marcadores microssatélites desenvolvidos para outras espécies do gênero *Duroia*, pode ser considerada a possibilidade de transferibilidade dos locos desenvolvidos nessas espécies.

Tabela 2 - Caracterização de microssatélites desenvolvidos para outras nove espécies pertencentes à Família Rubiaceae, comparada à caracterização realizada para *Duroia macrophylla* realizada neste trabalho.

Espécie	Nº de locos desenvolvidos	Nº de locos polimórficos	A	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	Referência
<i>Coffea arabica</i>	16	9	2-3	0 - 0,72	*	Baruah et al. (2003)
<i>Coffea canephora</i>	*	12	2-5	0,18 - 0,91	0,24 – 0,73	Poncet et al. (2007)
<i>Genipa americana</i>	32	17	2-8	0,24 – 1,00	0,22 - 0,78	Manoel et al. (2014)
<i>Mussaenda pubescens</i>	19	17	1-8	0 – 1,00	0 - 0,88	Duan et al. (2012)
<i>Hedyotis chrysotricha</i>	*	12	3-8	0,12 - 0,95	0,16 - 0,82	Yuan et al. (2012)
<i>Luculia yunnanensis</i>	13	10	3-7	0,04 - 0,84	0,57 - 0,76	Zhou et al. (2010)
<i>Luculia yunnanensis</i>	24	11	2-4	0 - 0,83	0,43 - 0,77	Ma et al. (2012)
<i>Bathysa australis</i>	10	9	5-13	0,33 - 0,90	0,56 - 0,90	Reis et al. (2013)
<i>Alibertia edulis</i>	50	10	2-11	0,09 – 1,00	0,10 - 0,94	Dantas et al. (2019)
<i>Duroia macrophylla</i>	24	22	1-9	0,14 - 0,84	0,13 - 0,83	Este trabalho

## Conclusões gerais

### Capítulo I

- O tratamento 6 apresentou maior concentração de DNA genômico e mostrou diferença significativa em relação aos demais tratamentos na análise por espectrofotometria; Infere-se que as modificações que ocasionaram uma maior eficiência na extração de DNA neste tratamento foram a fragmentação com disruptor automático e o tempo e temperatura de precipitação de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  *overnight*, já que esses dois fatores também se mostraram estatisticamente diferentes;
- Houve grande diferença entre as concentrações aferidas por fluorometria e espectrofotometria, porém, verificou-se que as oriundas do Qubit podem ser consideradas mais fidedignas pois se apresentavam mais próximas do que havia sido observado em eletroforese em gel de agarose;
- 91,6% das amostras apresentaram bandas nítidas, representando presença e integridade relevante de DNA genômico;
- O tratamento 7 apresentou valores de absorvância  $A_{260}/A_{280}$  dentro do intervalo tido como ótimo para representar amostras puras e livres de contaminação;
- O rendimento das amplificações foi maior quando as amostras de DNA genômico foram diluídas de 1 para 15, pois a diluição reduz a concentração de possíveis inibidores de PCR.

### Capítulo II

- Os resultados obtidos neste estudo são os primeiros no nível molecular no qual são utilizadas regiões codificadoras e não codificadoras do DNA cloroplastidial, bem como o marcador ITS oriundo do genoma nuclear para a espécie *D. macrophylla*;
- Dentre os 13 marcadores cloroplastidiais analisados, 11 apresentaram-se monomórficos e dois (N e T3) apresentaram baixo nível de polimorfismo;
- O marcador ITS apresentou maior nível de polimorfismo intra e interespecífico comparado aos marcadores cloroplastidiais, com isso, pode ser o marcador baseado em sequências de DNA mais suscetível a análises de genética populacional para a espécie *D. macrophylla*.



### **Capítulo III**

- Foram desenvolvidos pela primeira vez 24 marcadores moleculares microssatélites para a espécie *D. macrophylla*, dentre os quais foram identificados 22 loci polimórficos e dois monomórficos;
- Os marcadores microssatélites poderão ser utilizados em estudos de genética populacional com o intuito de subsidiar políticas de conservação e manejo de *D. macrophylla*.

## Referências

- Álvarez, I.; Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417–434.
- Alves, H.S. 2005. *Sequenciamento e análise do genoma cloroplastidial de eucalipto (Eucalyptus grandis)*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 64p.
- Andersson, L.; Rova, J.H.E. 1999. The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 214: 161–186.
- Aras, S.; Duran, A.; Yenilmez, G. 2003. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 461a-461f.
- Arruda, S.R.; Pereira, D.G.; Brito, M.G.; Waldschmidt, A.M. 2017. An optimized protocol for DNA extraction in plants with a high content of secondary metabolites, based on leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). *Genetics and Molecular Research* 16: 1–9.
- Atherly, A.G.; Girton, J.R.; McDonald, J.F. 1999. *The science of genetics*. Saunders College Publishing, 704p.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, 541p.
- Barbosa, M.R.; Zappi, D.; Taylor, C.; Cabral, E.; Jardim, J.G.; Pereira, M.S.; et al. 2015. *Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210>). Accessed on 19 Jun. 2022.
- Baruah, A.; Naik, V.; Hendre, P.S.; Rajkumar, R.; Rajendrakumar, P.; Aggarwal, R.K. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. *Molecular Ecology Notes* 3: 647–650.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.L.; Risterucci, a M.; Baurens, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits (Paris)* 54: 277–288.
- Bolson, M.; De Camargo Smidt, E.; Brotto, M.L.; Silva-Pereira, V. 2015. ITS and trnH-psbA as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from southern brazilian atlantic rainforests. *PLoS ONE* 10: e0143049.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* 32: 314–331.

- Brasil, F. do. 2022. Rubiaceae in flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.
- Braukmann, T.W.A.; Kuzmina, M.L.; Sills, J.; Zakharov, E. V.; Hebert, P.D.N. 2017. Testing the efficacy of DNA barcodes for identifying the vascular plants of Canada. *PLoS ONE* 12: e0169515.
- Bremer, B. 2009. A Review of Molecular Phylogenetic Studies of Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 4–26.
- Bremer, B.; Eriksson, T. 2009. Time Tree of Rubiaceae: Phylogeny and Dating the Family, Subfamilies, and Tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170: 766–793.
- Bressan, E.A.; Rossi, M.L.; Gerald, L.T.; Figueira, A. 2014. Extraction of high-quality DNA from ethanol-preserved tropical plant tissues. *BMC Research Notes* 7: 1–6.
- Caixeta, E.T.; Oliveira, A.C.B. de; Brito, G.G. de; Sakiyama, N.S. 2006. Tipos de marcadores moleculares. In: *Borém, A.; Caixeta, E.T. Marcadores moleculares*: 307–374.
- Cameron, K.M.; Chase, M.W.; Anderson, W.R.; Hills, H.G. 2001. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *American Journal of Botany* 88: 1847–1862.
- Campos, M.T.V.; Brito, J.M. 1999. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. INPA, Manaus, 798p.
- Cardoso, D.; Särkinen, T.; Alexander, S.; Amorim, A.M.; Bittrich, V.; Celis, M.; et al. 2017. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 10695–10700.
- Carvalho, A.B.; Ramos, D.M.; Nunez, C. V. 2021. Actividad antiangiogénica de los extractos diclorometánicos de hojas y ramas de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *Med. plant commun* 4: 82–86.
- Casiraghi, M.; Labra, M.; Ferri, E.; Galimberti, A.; Mattia, F. De. 2010. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in bioinformatics* 11: 440–453.
- Cavaluzzi, M.J.; Borer, P.N. 2004. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic acids research* 32: e13–e13.
- CBOL, P.W.G. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12794–12797.
- Chaney, L.; Mangelson, R.; Ramaraj, T.; Jellen, E.N.; Maughan, P.J. 2016. The complete chloroplast genome sequences for four *Amaranthus* species (Amaranthaceae).

- Applications in Plant Sciences* 4: 1600063.
- Chung, H.Y.; Won, S.Y.; Kim, Y.K.; Kim, J.S. 2019. Development of the chloroplast genome-based InDel markers in Niitaka (*Pyrus pyrifolia*) and its application. *Plant Biotechnology Reports* 13: 51–61.
- Clegg, M.T.; Gautt, B.S.; Learn, G.H.; Morton, B.R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 6795–6801.
- Coelho, L.M. 2018. *Estudo proteômico de calos, folhas e galhos de Duroia macrophylla Huber (Rubiaceae)*. Universidade Federal do Amazonas, 242p.
- Cole, C.T.; Biesboer, D.D. 1992. Monomorphism, reduced gene flow, and cleistogamy in rare and common species of *Lespedeza* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 79: 567–575.
- Condit, R.; Hubbell, S.P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66–71.
- Cordell, G.A.; Quinn-Beattie, M. Lou; Farnsworth, N.R. 2001. Strategy for a Waste free Ontario. *Phytotherapy Research* 15: 183–205.
- Couch, J.A.; Fritz, P.J. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter* 8: 8–12.
- Cours, J.; Larrieu, L.; Lopez-Vaamonde, C.; Müller, J.; Parmain, G.; Thorn, S.; et al. 2021. Contrasting responses of habitat conditions and insect biodiversity to pest- or climate-induced dieback in coniferous mountain forests. *Forest Ecology and Management* 482.
- Cristóbal-Pérez, E.J.; Fuchs, E.J.; Lobo, J.; Quesada, M. 2022. Genetic diversity, asexual reproduction and conservation of the edible fruit tree *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) in the Costa Rican tropical dry forest. *PLoS ONE* 17: 1–15.
- Dantas, L.G.; Alencar, L.; Huettel, B.; Pedrosa-Harand, A. 2019. Development of ten microsatellite markers for *Alibertia edulis* (Rubiaceae), a Brazilian savanna tree species. *Molecular Biology Reports* 46: 4593–4597.
- Das, A.; Kumar, R.; Harshwardhan, Y. 2022. Population structure, gene flow and genetic diversity analyses based on agro-morphological traits and microsatellite markers within cultivated and wild germplasms of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.]. *Genetic Resources and Crop Evolution* 69: 771–791.
- Dellaporta, S.L.; Wood, J.; Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19–21.
- Delprete, P.G. 2010. *Flora dos estados de Goiás e Tocantins*. In: Gráfica e Editora Vieira (Ed.)

Goiânia, 1610p.

- Demeke, T.; Jenkins, G.R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 1977–1990.
- Deng, S. yong; Wang, X. rong; Zhu, P. lin; Wen, Q.; Yang, C. xia. 2015. Development of polymorphic microsatellite markers in the medicinal plant *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 58: 149–155.
- Devi, K.D.; Punyarani, K.; Singh, N.S.; Devi, H.S. 2013. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales- suitable for diverse PCR based downstream applications. *Springer* 2: 669–676.
- Dhakshanamoorthy, D.; Selvaraj, R. 2009. Extraction of genomic DNA from *Jatropha* sp. using modified CTAB method. *Rom. J. Biol. - Plant Biol.* 54: 117–125.
- Downie, S.R.; Palmer, J.D. 1992. Use of chloroplast DNA rearrangements in reconstructing plant phylogeny. In: Soltis, P.E.; Doyle, D.E.; Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plants*, London, p.14–35.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Duan, B.; Liu, W.; Li, S.; Yu, Y.; Guan, Y.; Mu, S.; et al. 2022. Microsatellite analysis of genetic diversity in wild and cultivated *Portunus trituberculatus* in Bohai Bay. *Molecular Biology Reports* 49: 2543–2551.
- Duan, T.T.; Gong, W.; Zhang, D.X. 2012. Development of microsatellite markers from *Mussaenda pubescens* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 99: 437–439.
- Farias, F.M. 2006. *Psychotria myriantha* Müll arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiqumiotóxica e sobre o sistema nervoso central. 217p, (<http://hdl.handle.net/10183/8532>).
- Ferreira, E.B.; Cavalcanti, P.P.; Nogueira, D.A. 2013. Package ‘ExpDes. pt’: Pacote Experimental Designs. *R package version 1.2*.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética*. Vol. 2.3<sup>a</sup> ed. Embrapa- Cenargen, Brasília, 220p.
- Futuyma, D.J. 1992. *Biologia Evolutiva*. 2<sup>a</sup> edição ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, .
- GBIF. 2021. *Duroia macrophylla* Huber in *GBIF Secretariat*. GBIF Backbone Taxonomy. (<https://doi.org/10.15468/39omei>). Accessed on 09 Aug. 2022.

- Gore, P.G.; Gupta, V.; Singh, R.; Tripathi, K.; Kumar, R.; Kumari, G.; et al. 2022. Insights into the genetic diversity of an underutilized Indian legume, *Vigna stipulacea* (Lam.) Kuntz., using morphological traits and microsatellite markers. *PLoS ONE* 17: e0262634.
- Goudet, J. 2002. FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hamrick, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69: 1685–1693.
- Hamrick, J.L.; Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 351: 1291–1298.
- Heitzman, M.E.; Neto, C.C.; Winiarz, E.; Vaisberg, A.J.; Hammond, G.B. 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66: 5–29.
- Hoehne, F.C. 1939. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. Graphicars, São Paulo, 355p.
- ISO. 2005. *Foodstuffs: Nucleic acid based methods of analysis of genetically modified organisms and derived product*. Switzerland, 18p.
- IUCN. 2022. *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-1*. (<https://www.iucnredlist.org>). Accessed on 18 Oct. 2022.
- Judd, W.S.; Stevens, P.F.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Campbell, C. 2002. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. In: Associates, S.S. (Ed.) .
- Katterman, F.R.H.; Shattuck, V.I. 1983. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of Gossypium Species That Contain Large Amounts of Phenolic Terpenoids and Tannins. *Preparative Biochemistry* 13: 347–359.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Kirouani, A.; Henkrar, F.; Udupa, S.M.; Boukhalfoun, L.; Bouzerzour, H. 2018. Genetic diversity in Algerian durum wheat varieties (*Triticum turgidum* L var. *durum*) using microsatellite markers. *Bioscience Journal* 34: 1575–1583.
- Lange, C.; Goeke, D.F.; Hickman, D.T.; Podolyan, A.; Houliston, G.J. 2018. Chloroplast

- diversity of giant buttercup (*Ranunculus acris* L., Ranunculaceae) in New Zealand and in its native range. *New Zealand Journal of Botany* 56: 385–395.
- Li, D.Z.; Gao, L.M.; Li, H.T.; Wang, H.; Ge, X.J.; Liu, J.Q.; et al. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19641–19646.
- Li, X.; Yang, Y.; Henry, R.J.; Rossetto, M.; Wang, Y.; Chen, S. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological reviews* 90: 157–166.
- Lima, L. de O.; Silva, M.R.; Magalhães, L.O.; Morais, G.C.; Silva, R.N.O. 2020. Comparação de protocolos de extração de DNA genômico de *Capsicum* spp. *Brazilian Journal of Development* 6: 26419–26434.
- Lipp, M.; Shillito, R.; Giroux, R.; Spiegelhalter, F.; Charlton, S.; Pinero, D.; et al. 2005. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International* 88: 136–155.
- Lis, J.T.; Schleif, R. 1975. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research* 2: 383–390.
- Lodhi, M.A.; Ye, G.N.; Weeden, N.F.; Reisch, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 6–13.
- Luz, T.Z. 2019. *Caracterização genética de Banisteriopsis cf. caapi (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton (Malpighiaceae), um cipó utilizado no preparo do chá ayahuasca*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1–99p.
- Ma, H.; Wang, L.; Wan, Y.; Li, H.; Li, Z.; Liu, X.; et al. 2012. A set of novel microsatellite markers developed for *Luculia yunnanensis* (Rubiaceae), an endangered plant endemic to Yunnan, China. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 534–539.
- Mabberley, D.J. 1997. *The Plant-book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants*. Cambridge university press, .
- Mäder, G.; Zamberlan, P.M.; Fagundes, N.J.R.; Magnus, T.; Salzano, F.M.; Bonatto, S.L.; et al. 2010. The use and limits of ITS data in the analysis of intraspecific variation in *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology* 33: 99–108.
- Manoel, R.O.; Freitas, M.L.M.; Barreto, M.A.; Moraes, M.L.T.; Souza, A.P.; Sebbenn, A.M. 2014. Development and characterization of 32 microsatellite loci in *Genipa americana*

- (Rubiaceae). *Applications in Plant Sciences* 2: 1300084.
- Martins, A.P.V. 2011. *Desenvolvimento de marcadores microssatélites e variabilidade genética em populações de Vellozia gigantea (Velloziaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, Minas Gerais*. 89p.
- Martins, D. 2014. *Estudo químico e biológico de Duroia macrophylla Huber (Rubiaceae)*. Universidade Federal do Amazonas, 231p.
- Martins, D.; Nunez, C.V. 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* 20: 13422–13495.
- Martins, D.; Carrion, L.L.; Ramos, D.F.; Salomé, K.S.; Eduardo, P.; Barison, A.; et al. 2013. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). 2013.
- Martins, D.; Carrion, L.L.; Ramos, D.F.; Salomé, K.S.; Eduardo, P.; Andersson, B.; et al. 2014a. Anti-tuberculosis activity of oleanolic and ursolic acid isolated from the dichloromethane extract of leaves from *Duroia macrophylla*. *BMC Proceedings* 8: P3.
- Martins, D.; Fachin-espinar, M.T.; Oliveira, T.A. De; Lima, K.C.S.; Cavalcanti, R.M.; Teles, B.R.; et al. 2014b. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 2: 158–171.
- Martins, W.S.; Lucas, D.C.S.; Neves, K.F. de S.; Bertioli, D.J. 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development. *Bioinformation* 3: 282–283.
- Mekbib, Y.; Saina, J.K.; Tesfaye, K.; Eshetu, G.; Hu, G.; Chen, J.; et al. 2020. Chloroplast genome sequence variations and development of polymorphic markers in *Coffea arabica*. *Plant Molecular Biology Reporter* 38: 491–502.
- Melo, M.F. de V. 2016. *Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em jenipapo (Genipa americana Linnaeus) utilizando marcadores microssatélites*. Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, 64p.
- Mesquita, D.W.O.; Mesquita, A.S.S.; Cursino, L.M.C.; Souza, E.S.; Oliveira, A.C.; Pinheiro, C.C.S.; et al. 2015. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17: 604–613.
- Mezzasalma, V.; Bruni, I.; Fontana, D.; Galimberti, A.; Magoni, C.; Labra, M. 2017. A DNA barcoding approach for identifying species in Amazonian traditional medicine: The case



- of Piri-Piri. *Plant Gene* 9: 1–5.
- Michel, F.; Kazuhiko, U.; Haruo, O. 1989. Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns—a review. *Gene* 82: 5–30.
- Mishra, P.; Kumar, A.; Nagireddy, A.; Mani, D.N.; Shukla, A.K.; Tiwari, R.; et al. 2016. DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal* 14: 8–21.
- MOBOT. 2022. *Missouri Botanical Garden – MOBOT. Família Rubiaceae.* (<http://www.tropicos.org/Name/42000315>). Accessed on 09 Aug. 2022.
- Mondini, L.; Noorani, A.; Pagnotta, M.A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1: 19–35.
- Morand, M.E.; Brachet, S.; Rossignol, P.; Dufour, J.; Frascaria-Lacoste, N. 2002. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology* 11: 377–385.
- Morgante, M.; Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175–182.
- Mouly, A.; Kainulainen, K.; Persson, C.; Davis, A.P.; Wong, K.M.; Razafimandimbison, S.G.; et al. 2014. Phylogenetic structure and clade circumscriptions in the Gardenieae complex (Rubiaceae). *Taxon* 63: 801–818.
- Murray, M.G.; Pitas, J.W. 1996. Plant DNA from alcohol-preserved samples. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 261–265.
- Nasário, J.P.. 2018. *Cariótipos e evolução cromossômica do clado Spermacoce e diversidade genética de *Psyllocarpus laricoides* Mart. & Zucc. (Rubiaceae).* Universidade Estadual de Campinas, 155 pp.
- Nascimento, J. de M. 2013. *Duroia L.f (Gardenieae- Rubiaceae) na Amazônia Brasileira.* Universidade Federal Rural da Amazônia e do Museu Paraense Emílio Goeldi, 79p.
- Nunez, C. V.; Martins, D.; Ramos, D.F.; Silva, P.E.A. 2014. Uso de composto, método ex-vivo, processo e extrato purificado. 2014, Brasil. *Patente: Privilégio de Inovação.*
- Nunez, C. V.; Santos, P.A.; Roumy, V.; Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Mesquita, A.S.S.; et al. 2009. Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Planta medica* 75: 1037–1037.
- Nunez, C. V; Vasconcelos, M.C. 2012. Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. *Patente: Privilégio de Inovação.*

- Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R.; Vieira, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.
- Oliveira, L.C.; Rodrigues, D.P.; Hopkins, M.J.G. 2017. Comparação de seis protocolos de extração de DNA para análises moleculares em espécies de Fabaceae. *Scientia Amazonia* 6: 38–45.
- Oliveira, P.L. 2009. *Contribuição ao estudo de espécies da Família Rubiaceae: Fitoquímica da espécie Amaioua guianensis Aubl.* Universidade Federal de Goiás, 154p.
- Oosterhout, C. V.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
- Ostrowska, E.; Muralitharan, M.; Chandler, S.; Volker, P.; In, S.; Cellular, V.; et al. 1998. Optimizing conditions for DNA isolation from *Pinus radiata*. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34: 108–111.
- Ouborg, N.J.; Piquot, Y.; Van Groenendael, J.M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of ecology* 87: 551–568.
- Paetkau D.; Calvert W.; Stirling I.; Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polars bears. *Molecular Ecology* 4: 347–354.
- Palmer, J.D. 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *The american naturalist* 130: S6–S29.
- Paradis, E. 2010. pegas: An R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* 26: 419–420.
- Paradis, E.; Schliep, K. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35: 526–528.
- Park, S.D.E. 2001. *Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection.* University of Dublin.
- Parry, M.A.J.; Keys, A.J.; Madgwick, P.J.; Carmo-silva, A.E.; Andralojc, P.J. 2008. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany* 59: 1569–1580.
- Peist, R.; Honsel, D.; Twieling, G.; Loffert, D. 2001. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *Qiagen news* 3: 7–9.
- Persson, C. 2000. Phylogeny of the Neotropical *Alibertia* group (Rubiaceae), with emphasis on the genus *Alibertia*, inferred from its and 5s ribosomal DNA sequences. *American Journal of Botany* 87: 1018–1028.

- Poncet, V.; Dufour, M.; Hamon, P.; Hamon, S.; De Kochko, A.; Leroy, T. 2007. Development of genomic microsatellite markers in *Coffea canephora* and their transferability to other coffee species. *Genome* 50: 1156–1161.
- Queller, D.C.; Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258–275.
- van Raamsdonk, L.W.D.; Ensink, W.; van Heusden, A.W.; Ginkel, M.V.; Kik, C. 2003. Biodiversity assessment based on cpDNA and crossability analysis in selected species of *Allium subgenus* Rhizirideum. *Theor Appl Genet* 107: 1048–1058.
- Raimundo, J.; Manuel, C.; Reis, G.; Ribeiro, M.M. 2018. Rapid, simple and potentially universal method for DNA extraction from *Opuntia* spp. fresh cladode tissues suitable for PCR amplification. *Molecular Biology Reports* 45: 1405–1412.
- Ramos, S.L.F.; Dequigiovanni, G.; Sebbenn, A.M.; Lopes, M.T.G.; de Macêdo, J.L.V.; Veasey, E.A.; et al. 2018. Paternity analysis, pollen flow, and spatial genetic structure of a natural population of *Euterpe precatória* in the Brazilian Amazon. *Ecology and Evolution* 8: 11143–11157.
- Ratnasingham, S.; Hebert, P.D.N. 2007. BOLD: The barcode of life data system: barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *The Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Reis, A.J.; Carrion, L.L.; Rodrigues, K.; Fenalti, J.M.; Mata-Santos, T.; Scaini, C.J.; et al. 2016. Avaliação das atividades antifúngica, antimicobacteriana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. *Revista de epidemiologia e controle de infecção* 1: 108–124.
- Reis, T.S.; Ciampi-Guillard, M.; Baldauf, C.; Souza, A.P.; Santos, F.A.M. Dos. 2013. Characterization of 10 microsatellite loci for *Bathysa australis* (Rubiaceae). *Applications in Plant Sciences* 1: 1300055.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Romano, E.; Brasileiro, A.C.M. 1999. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia ciência e desenvolvimento*: 40–43.
- Rossen, L.; Nørskov, P.; Holmstrøm, K.; Rasmussen, O.F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* 17: 37–45.
- Rozas, J.; Ferrer-mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-

- Onsins, S.E.; et al. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299–3302.
- Ruzza, D.A.C.; Rossi, A.A.B.; Fernandes, J.M.; Pedri, E.C.M. de; Tiago, A.V.; Bispo, R.B.; et al. 2020. Etnobotânica do Jenipapo (*Genipa Americana* L., Rubiaceae) entre agricultores no município de Carlinda, Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal of Development* 6: 61161–61184.
- Ryzhova, N.N.; Kholda, O.A.; Kochieva, E.Z. 2009. Structural characteristics of the chloroplast *rps16* intron in *Allium sativum* and related *Allium* species. *Molecular Biology* 43: 766–775.
- Sahu, S.K.; Thangaraj, M.; Kathiresan, K. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Network* 2012: 6.
- Sambrook, J.F.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100p.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments - A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American journal of botany* 94: 275–288.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Beck, J.T.; Farmer, S.B.; Liu, W.; Miller, J.; et al. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166.
- Silva, G.A.R.; Jojima, C.L.; Moraes, E.M.; Antonelli, A.; Manfrin, M.H.; Franco, F.F. 2016. Intra and interspecific sequence variation in closely related species of *Cereus* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 65: 137–142.
- Da Silva, L.J. 2010. Laercio-package: Duncan test, Tukey test and Scott-Knott test Version 1.0-1. .
- Soberón, J. 2007. Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters* 10: 1115–1123.
- Spalik, K.; Downie, S.R.; Watson, M.F. 2009. Generic delimitations within the *Sium* alliance (Apiaceae tribe Oenantheae) inferred from cpDNA *rps16-5'trnK* (UUU) and nrDNA ITS

- sequences. *Taxon* 58: 735–748.
- Stanford, A.M.; Harden, R.; Parks, C.R. 2000. Phylogeny and biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on *matK* and ITS sequence data. *American Journal of Botany* 87: 872–882.
- Štorchová, H.; Olson, M.S. 2007. The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 268: 235–256.
- Strand, M.; Prollat, T.A.; Liskayt, R.M.; Petes, T.D. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274–276.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38: 3022–3027.
- Taylor, C.M.; Campos, M.T.V.A.; Zappi, D. 2007. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. *Rodriguesia* 58: 549–616.
- Taylor, C.M.; Steyermark, J.A.; Delprete, P.G.; Vicentini, A.; Cortés, R.; Zappi, D.; et al. 2004. Rubiaceae. *Flora of the Venezuelan Guayana* 8: 497–847.
- Terry, C.F.; Harris, N.; Parkes, H.C. 2002. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International* 85: 768–774.
- Vasconcelos, S.; Nunes, G.L.; Dias, M.C.; Lorena, J.; Oliveira, R.R.M.; Lima, T.G.L.; et al. 2021. Unraveling the plant diversity of the Amazonian canga through DNA barcoding. *Ecology and Evolution*: 13348–13362.
- Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> · (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7: 524–530.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc, p.315–322.
- Yuan, N.; Sun, Y.; Nakamura, K.; Qiu, Y.X. 2012. Development of microsatellite markers in heterostylous *Hedyotis chrysotricha* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 99: 2010–2012.
- Zampieri, N.E.; Pau, S. 2022. The effects of fire, climate, and species composition on longleaf

pine stand structure and growth rates across diverse natural communities in Florida. *Forest Ecology and Management* 526: 120568.

Zappi, D. 2015. *Duroia* in *Lista de Espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB24436>). Accessed on 04 Jul. 2022.

Zhou, W.; Wang, H.; Li, D.Z.; Yang, J.B.; Zhou, W. 2010. Isolation and characterization of 13 microsatellite loci from *Luculia pinceana* (Rubiaceae), a typical distylous species. *HortScience* 45: 840–841.