



**Universidade Federal do Piauí
Rede Nordeste de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

ELISA APARECIDA ALVES PAIVA

**ANÁLISE GENÉTICA DO GÊNERO *Cenostigma* (FABACEAE:
CAESALPINIOIDAE)**

**TERESINA-PI
2016**

ELISA APARECIDA ALVES PAIVA

**ANÁLISE GENÉTICA DO GÊNERO *Cenostigma* (FABACEAE:
CAESALPINIOIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO ponto focal: Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz

TERESINA-PI

2016

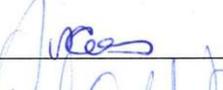
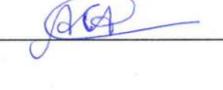
FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: ELISA APARECIDA ALVES PAIVA

TÍTULO DO PROJETO: "Análise molecular do gênero *Cenostigma* (Fabaceae: Caesalpinioideae)."

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz - EMBRAPA (Presidente)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes - UFPI (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	<u></u>
Prof. Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima – EMBRAPA (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>
Profa. Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u></u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 12 de setembro de 2016.

HORÁRIO: 08h30min

LOCAL: Auditório do NUPCelt/CCA/UFPI.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

P149a Paiva, Elisa Aparecida Alves.
Análise genética do gênero *Cenostigma* (Fabaceae:
Caesalpinioideae)
/ Elisa Aparecida Alves Paiva. – 2016.
107 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal
do Piauí, Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de
Biotecnologia, Teresina, 2016.

“Orientador: Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz”.

1. Caneleiro. 2. Diversidade Genética. 3. Conservação de
Espécies Nativas. I. Título.

CDD 581.3|

À Sagrada Família Jesus, Maria e José...

OFEREÇO

Aos meus filhos Luís Felipe e Laís, aos meus pais Luís Paiva e Luísa Helena Alves Paiva, aos meus irmãos Igor e Luígi e a minhas sobrinhas Débora e Maria Cecília.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu imenso amor misericordioso;

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pela oportunidade de realização do curso e por proporcionar aperfeiçoamento e qualificação profissional;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Meio-Norte) e ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho, aos funcionários pelo apoio e amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao pesquisador Dr. Fábio Mendonça Diniz, pelo seu comprometimento, por seu exemplo de profissionalismo, por estar sempre disposto a compartilhar seu conhecimento, pelo encorajamento nos momentos difíceis e por sua paciência para comigo.

À professora Dr^a. Maria Claudene Barros, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pela parceira junto ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular;

Ao pesquisador Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, por sua disponibilidade, pelo incentivo, ensinamentos e amizade;

Ao professor Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva, pela compreensão e incentivo;

À querida professora Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes, pela amizade, pela atenção a mim dispensada, pelo incentivo constante e incansável.

Aos professores da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, pelas disciplinas ministradas, pela partilha do conhecimento e aos colegas de turma, pelo laço fraterno, incentivos e ensinamentos;

À professora Fernanda Regina de Castro Almeida, pela atenção e apoio quando precisei.

A todos que me ajudaram na coleta do material, professora Lidiane Feitoza, professora Regina, Lívia do Vale, Pollyana Bacelar, Sarah, Nice, Bruno, Stanley, Pedro Guimarães que se aventuraram mata adentro comigo em busca das amostras utilizadas neste trabalho;

Aos amigos e colegas de convívio diário no Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Cíntia Clementino por compartilhar seus saberes de forma generosa. Ao Leonardo Furtado, técnico de laboratório, pelo apoio no trabalho de bancada;

Às amigadas que nasceram deste curso e que quero levar para a vida toda: Rosimere Amaral, Adriana Márcia, Jéssica Lustosa, Polyana Bacelar, Michelli Ferreira, Isis Sousa, pela presença, incentivo, pelo apoio nos momentos difíceis;

Ao colega, Geice pelo suporte nas análises realizadas neste trabalho;

Aos estagiários da Embrapa, que me auxiliaram neste período, em especial ao Stanley Sudario, à Bruna Rafaela Pessoa e à Emanuelli Pires.

À Grazielly de Araújo Santos, aluna de Bacharelado em Ciências Biológicas da UFPI, pelo auxílio na tradução dos artigos.

À grande amiga Flávia Franceli, amizade fruto da Renorbio, pelo companheirismo nas disciplinas e pelos momentos de descontração em Teresina;

À minha família, meus pais, irmãos e sobrinhas, que mesmo longe fisicamente foram grandes incentivadores, obrigada por serem meu alicerce, pelo apoio, amor e compreensão!

Aos meus filhos Luís Felipe e Laís, presentes de Deus na minha vida, que me fizeram seguir em frente mesmo em meio às dificuldades, alegrando meus dias.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

A minha eterna gratidão!!!

*“Nunca ores suplicando cargas mais
leves, e sim ombros mais fortes”.*

Santo Agostinho

PAIVA, E. A. A. **Análise genética do gênero *Cenostigma* (Fabaceae: Caesalpinioideae).** 2016. 107f. Tese (Doutorado) – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016¹.

RESUMO

Cenostigma (Fabaceae: Caesalpinioideae) é um pequeno gênero de árvores e arbustos endêmico do Cerrado Brasileiro que contém apenas duas espécies, *C. macrophyllum* e *C. tocantinum*, as quais se distribuem nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Apresentam potencial ornamental e são empregadas na arborização urbana de avenidas, praças e parques. Os extratos das folhas, casca do caule e das sementes de *C. macrophyllum* possuem atividades farmacológicas relevantes. Como muitas espécies nativas dessa região, permanecem ainda hoje pouco estudadas. O conhecimento da variabilidade genética dessas espécies poderá auxiliar na elaboração de estratégias de conservação. No presente estudo, quatro métodos de extração de DNA foram avaliados para *C. macrophyllum*, assim como a análise de diferentes tecidos vegetais como fonte de DNA de alto peso molecular. O sequenciamento de uma região intergênica do genoma cloroplástico (*cpDNA*), *psbB-psbF*, foi realizado com o intuito de conhecer a diversidade genética em populações naturais dessas espécies, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo e conservação. Os protocolos de extração de DNA mais rápidos e livres de reagentes tóxicos se mostraram eficientes e inovadores. A utilização de sementes e de folhas velhas como fonte de DNA revelaram resultados bastante otimistas. O estudo da região espaçadora intergênica *psbB-psbF* em 11 populações naturais de *C. macrophyllum* e uma de *C. tocantinum* revelou que a variabilidade genética dentro das populações é menor que a variabilidade entre as populações. Intervenções decorrentes da ação humana podem ter contribuído para restringir a variabilidade genética. Entretanto, é fundamental que a diversidade genética dentro dessas populações seja ampliada. Estes resultados obtidos, reforçam o potencial dessa sequência do *cpDNA* para a elucidação das relações entre espécies estreitamente relacionadas e contribuem com os estudos de genética de populações do gênero *Cenostigma*.

Palavras chave: Caneleiro. Diversidade Genética. Conservação de espécies nativas.

¹ Orientador: Pesquisador Dr. Fábio Mendonça Diniz

PAIVA, E. A. A. **Genetic analysis of *Cenostigma* genus (Fabaceae: Caesalpinioideae)**. 2016. 107f. Thesis (Ph.D.) – RENORBIO. Federal University of Piauí, Teresina, 2016¹.

ABSTRACT

Cenostigma (Fabaceae: Caesalpinioideae) is a small genus of endemic trees and shrubs of the Brazilian Cerrado containing only two species, *C. macrophyllum* and *C. tocantinum* that are distributed in the North and Northeast of Brazil. They have ornamental potential and are used in urban landscaping of avenues, squares and parks. Leaf extracts, stem bark and seeds *C. macrophyllum* have relevant pharmacological activities. Like many native species of the region, remain still little studied. Knowledge of the genetic variability of these species can help to develop conservation strategies. In this study, four DNA extraction methods were evaluated for *C. macrophyllum* well as the analysis of different plant tissues as a source of high molecular weight DNA. The sequencing of the intergenic region of chloroplast genome (*cpDNA*), *psbB-psbF* was conducted in order to know the genetic diversity in natural populations of these species in order to contribute to the development of effective management and conservation strategies. DNA extraction protocols faster and free of toxic reagents were efficient and innovative. The use of seeds and old leaves as a source of DNA revealed quite optimistic results. The study of intergenic spacer region *psbB-psbF* to 11 *C. macrophyllum* and *C. tocantinum* natural populations revealed that genetic variability within the population is less than the variability between people. Interventions resulting from human activity may have contributed to restrict the genetic variability. However, it is essential that the genetic diversity within these populations is expanded. These results reinforce the potential of this sequence of *cpDNA* to elucidate the relationship between closely related species and contribute to the genetic studies of populations *Cenostigma* gender.

Keywords: Caneleiro, genetic diversity, conservation of native species

¹Supervisor: Researcher Dr. Fábio Mendonça Diniz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Família Fabaceae.....	14
2.2 Compostos secundários e radicais livres presentes nas plantas.....	16
2.3 Gênero <i>Cenostigma</i>	18
2.3.1 <i>Cenostigma macrophyllum</i>	20
2.3.1.1 Constituintes químicos de <i>Cenostigma macrophyllum</i> e seu potencial como planta medicinal	23
2.3.2 <i>Cenostigma tocaninum</i>	27
2.4 Conservação de espécies arbóreas nativas	30
2.5 Genoma Cloroplastídico	32
2.6 Extração de DNA em plantas	33
2.7 Marcadores Moleculares para estudos de estrutura genética e filogeografia de plantas.....	37
2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO I	52
Comparação entre quatro métodos de extração de DNA de <i>Cenostigma macrophyllum</i> ¹	52
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	60
DISCUSSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	68
CAPÍTULO II	70
Folhas velhas como fonte de DNA para estudos moleculares em <i>Cenostigma macrophyllum</i> (Fabaceae: Caesalpinioideae) ¹	70
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
INTRODUÇÃO	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
RESULTADOS.....	75
DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	80

CAPÍTULO III.....	82
Diferenciação estrutural interespecífica e intraespecífica nas espécies arbóreas <i>Cenostigma macrophyllum</i> e <i>Cenostigma tocantinum</i> (Fabaceae:Caesalpinioideae)	82
RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	84
INTRODUÇÃO	85
MATERIAL E MÉTODOS.....	86
RESULTADOS E DISCUSSÃO	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

Cenostigma é um gênero de árvores e arbustos nativos do Brasil pertencente à família Fabaceae. Foi descrito primeiramente por Tulasne (1843), que reconheceu inicialmente três espécies estreitamente relacionadas: *C. angustifolium* Tul., *C. gardnerianum* Tul. e *C. macrophyllum* Tul.. De acordo com dados da literatura com base em estudos morfológicos como características das folhas e da vagem, entre as espécies deste gênero, discute-se a possibilidade da existência de três a seis espécies. No entanto, uma revisão mais criteriosa, fundamentada nos aspectos morfológicos (WARWICK; LEWIS, 2009) evidenciou a ocorrência de apenas duas espécies, *C. macrophyllum* Tul. e *C. tocaninum* Tul..

Estas espécies apresentam potencial ornamental e vêm sendo utilizadas em projetos de arborização urbana de avenidas, praças e parques devido aos seus aspectos favoráveis como tronco reto, crescimento rápido, copa frondosa e sistema radicular pouco agressivo. Por serem nativas, apresentam maior resistência a doenças. *C. macrophyllum*, conhecida como caneleiro apresenta importantes propriedades farmacológicas que chamam a atenção da indústria farmacêutica.

Com a expansão da agricultura, principalmente no Cerrado brasileiro, as espécies nativas e endêmicas deste bioma ficam expostas à fragmentação do seu habitat, o que compromete a preservação da variabilidade genética existente. Ter o conhecimento da real variabilidade e compreender como ela se distribui nas populações naturais constitui a base para uma efetiva atuação dos programas de conservação. Este conhecimento possibilitará a adoção de estratégias efetivas de manejo que visem à conservação das espécies *C. macrophyllum* e *C. tocaninum*.

Na literatura, não foram encontrados trabalhos que descrevam o gênero *Cenostigma* sob a ótica da Biologia Molecular. Informações básicas como o protocolo de extração de DNA mais eficiente, o tecido vegetal mais apropriado a ser utilizado, são escassas. Referências como estas são importantes para que estudos futuros, que possibilitarão conhecer a variabilidade genética existente nas populações naturais, sejam realizados. O conhecimento da diversidade efetiva é de fundamental importância para se elucidar a biologia da espécie (BRAMMER, 2002), e fornecer informações sobre o seu sistema de reprodução.

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e atualmente, é considerado um dos *hotspot* da biodiversidade mundial. A manutenção do germoplasma que represente a variação genética existente neste bioma pode garantir o potencial evolutivo das espécies nativas. A partir de informações sobre a base genética, as melhores estratégias de conservação das

espécies em questão poderão ser discutidas. Neste contexto, os marcadores moleculares se destacam como uma ferramenta poderosa para fins de diagnóstico desta variabilidade, visando o aproveitamento dessa informação no delineamento de estratégias para a conservação dessas espécies.

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo, disponibilizar informações sobre os métodos de extração de DNA mais eficientes para *C. macrophyllum*, bem como, propor uma discussão a respeito dos tecidos vegetais utilizados como fonte de DNA de alto peso molecular. E, com base na região intergênica do genoma cloroplastítico (*cpDNA*), *psbB-psbF*, conhecer a diversidade genética em populações naturais das espécies do gênero *Cenostigma*, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo e conservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Fabaceae

Fabaceae (Leguminosae) é a terceira maior família de plantas no mundo, se destaca tanto em número de gêneros e espécies como em importância econômica. Engloba 36 tribos, cerca de 730 gêneros e quase 20.000 espécies descritas, distribuídas em três subfamílias: Papilionoideae (Faboideae), Mimosoideae e Caesalpinioideae (LEWIS et al., 2005). Uma característica típica dessa família é a ocorrência do fruto tipo legume, conhecido também como vagem, exclusivo desse grupo.

Sua origem é controversa, há registros fósseis encontrados na América do Norte, Europa, África e Ásia, que indicam o seu surgimento há pelo menos 60 milhões de anos e que teve uma rápida diversificação por toda a Terra. Está presente tanto nas florestas tropicais quanto desertos, planícies e regiões alpinas, com representantes dos mais diversos tipos de hábitos, tais como árvores, arbustos, lianas e até plantas aquáticas. Embora as plantas dessa família sejam encontradas em praticamente todas as formações vegetais do planeta, o seu atual centro de endemismo é a região neotropical (LAVIN et al., 2004). Essa alta capacidade de distribuição confere à família uma relevante importância ecológica, tornando-a indispensável à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas como um todo (AMORIM et al., 2016).

Durante um período, houve controversas com relação a tratar o grupo como uma única família (Fabaceae) composta de três subfamílias (Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae) (QUEIROZ, 2009; LEWIS et al., 2005; VALLE et al., 2006), ou como três famílias separadamente (Fabaceae, Caesalpinioideae e Mimosaceae), dentro da ordem Leguminales, considerando neste caso Leguminosae como ordem (Leguminales), pelo fato de serem muito diversas entre si, posição esta, adotada pelos taxonomistas Cronquist (1981), Dahlgren (1983), entre outros. Estes autores consideraram as características diagnósticas das subfamílias de Fabaceae consistentes para elevá-las à categoria de famílias. Entretanto, estudos filogenéticos demonstraram a origem evolutiva comum do grupo, indicando que seria mais apropriado tratar o grupo como uma única família (CHAPPILL, 1995; QUEIROZ, 2009; SOUZA; LORENZI, 2012).

No Brasil, a família Fabaceae é uma das mais representativas, apresentando 2.807 espécies em 222 gêneros, dos quais 168 gêneros e 1083 espécies dispersam-se na região

Nordeste (LIMA, 2000). Nos ecossistemas florestais, as espécies arbóreas se destacam (DUCKE, 1949; SILVA, 2008). Na caatinga, estão presentes 127 gêneros com 593 espécies, das quais 149 são endêmicas (LIMA; MELO, 2015).

No Cerrado, Fabaceae constitui a família mais representativa em número, com cerca de 750 espécies, distribuídas em 101 gêneros. Por ser o segundo maior bioma brasileiro, cobrir 25% do território nacional e ser considerado como um dos *hotspot* da biodiversidade mundial, o Cerrado merece destaque. Sua flora está entre as mais ricas do mundo e suas espécies apresentam alto potencial alimentar, agroindustrial, madeireiro, forrageiro, combustível, ornamental e medicinal (RATTER; RIBEIRO; BRIGGEWATER, 1977; MENDONÇA et al., 1998; MYERS et al., 2000; MEDINA, 1959). Apresenta grande diversidade de habitats e alternância de espécies, sendo que 44% da sua flora é endêmica e constitui a mais diversificada savana tropical do mundo. Dentre as espécies de ocorrência restrita, as do gênero *Cenostigma* são exemplos. A vegetação nativa do Cerrado é uma das que mais sofreu com a ocupação humana e continua sofrendo intensa redução da extensão da sua vegetação, sendo superado apenas pela Mata Atlântica. A pressão crescente pelo desmatamento de novas áreas para a expansão agrícola e agropecuária, especialmente no Brasil, está levando à exaustão progressiva dos recursos naturais da região (AVIDOS; FERREIRA, 2000; MEDEIROS, 2011).

Das subfamílias, a Papilionoideae é a maior, apresentando cerca de 13.800 espécies distribuídas em 476 gêneros (LEWIS et al., 2005; POLHILL, 1981). É também a de maior importância econômica e a que apresenta maior número de espécies capazes de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, relação harmônica valorosa, fundamental na agricultura em sistemas de rotação de culturas. Por participarem ativamente no ciclo do nitrogênio atmosférico, essas espécies apresentam um importante papel na manutenção da sustentabilidade dos solos e na recuperação de áreas degradadas (MEDINA, 1959; POLHILL, 1981). Mimosoideae é a segunda maior subfamília, conta com 3.270 espécies pertencentes a 77 gêneros (ELIAS, 1981; LEWIS et al., 2005), distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo.

Predominantemente tropical, Caesalpinioideae constitui a menor e a menos conhecida das subfamílias das Fabaceae. Está subdividida em quatro tribos, Cercidae, Cassieae, Detarieae e Caesalpinieae, na qual está inserido o gênero *Cenostigma*. Possui representantes nos mais variados habitats, principalmente na América do Sul, África Tropical e Sudoeste da Ásia (COWAN, 1981). Compreende cerca de 2.250 espécies distribuídas em 163 gêneros

(LEWIS et al., 2005). Lima et al. (2013), referem como nativos do Brasil 53 gêneros e 733 espécies, destacando o Cerrado com alta riqueza de espécies e endemismo.

A literatura afirma que na subfamília Caesalpinioideae, a capacidade de nodular e formar simbiose com bactérias fixadoras de N_2 é pouco frequente (BARBERI et al., 1998). Em estudos sobre a nodulação natural em leguminosas em solos do Cerrado no Piauí, Silva et al. (2009), confirmaram tal afirmação. Os autores argumentam que a ausência de nodulação nas Caesalpinioideae pode estar relacionada ao fato desta subfamília conter gêneros de espécies arbóreas mais arcaicas na escala de evolução das espécies (SPRENT, 2001) e estas serem incapazes de nodular.

Das três subfamílias, Papilionoideae e Mimosoideae são consideradas monofiléticas, o que significa que todos os descendentes dessas subfamílias compartilham um ancestral comum e exclusivo, enquanto que Caesalpinioideae é reconhecida como parafilética, compreendendo uma diversa reunião de linhagens não relacionadas, a maioria divergindo relativamente cedo na história da família e não possuindo alguns aspectos florais distintos, que são usados para agrupar os gêneros dentro das outras duas subfamílias (DOYLE; LUCKOW, 2003).

Segundo Lewis et al. (2005), as Caesalpinioideae formam a ramificação basal do clado da família, com Mimosoideae e Papilionoideae divergindo independentemente de um ancestral comum, como linhagens distintas. A posição basal da subfamília Caesalpinioideae, que é considerada a mais primitiva, foi sugerida a partir de registros fósseis e devido à sua ampla diversidade morfológica.

2.2 Compostos secundários e radicais livres presentes nas plantas

Fitoquimicamente, a família Fabaceae biossintetiza uma grande variedade de compostos secundários em seu metabolismo, metabólitos estes denominados especiais, incluindo essências, drogas, venenos e corantes (MARTINS et al., 1998). Com destaque notável para os metabólitos da classe dos flavonóides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenóides e isoflavonóides. Alcalóides, terpenóides e esteroides são exemplos de outras classes de substâncias que ocorrem em muitos exemplares da família. Os taninos tem frequência muito baixa se comparada aos flavonoides, tendo sido relatadas poucas ocorrências em Caesalpinioideae (CATAPANO, 1997; MURAKAMI et al., 1992).

Os metabólitos secundários nas plantas são considerados a feição da especialização celular, pois esses biossintetizados acumulados nas células vegetais teriam se formado e

evoluído como mecanismo de defesa às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996). Despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas nas plantas, em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também por possuírem atividade biológica marcante e imensa atividade farmacológica sobre a saúde da espécie humana.

A tribo Caesalpinieae acumula substâncias pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários (diterpenóides, triterpenóides, saponinas, alcaloides e flavonóides) e com várias atividades farmacológicas a elas atribuídas. As saponinas, nas plantas apresentam funções como regulação do crescimento, defesa contra insetos e patógenos. No organismo humano têm efeito antioxidante, onde se ligam a sais biliares e colesterol no tubo digestivo, impedindo a sua absorção, além de possuírem ação citotóxica atuando contra células tumorais (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007). Os flavonoides apresentam diferentes classes: antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas, com múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral. Desta forma, a ingestão de flavonoides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares.

Atualmente, os radicais livres têm sido considerados os grandes vilões da saúde, pois assim como outros oxidantes, apresentam papel determinante no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças degenerativas. A produção de radicais livres ocorre naturalmente como um processo fisiológico. Porém, em determinadas condições, pode ocorrer a elevação na produção das espécies reativas de oxigênio (ERO), levando ao estresse oxidativo, onde algumas espécies reativas como o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\bullet) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem produzir danos ao organismo como a lipoperoxidação de lipídios insaturados das membranas celulares. A lesão induzida por radicais livres constitui uma via final comum de lesão celular, por serem extremamente reativos e instáveis, participam de reações com substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, proteínas, lipídios, carboidratos, particularmente moléculas importantes nas membranas celulares e ácidos nucleicos (LEMOS, 2006).

As reações de radicais livres com a timina do DNA produzem quebras unifilamentares do DNA, que podem levar tanto à morte celular como à formação de células malignas (carcinogênese). Estudos indicam que os radicais livres agem acelerando o processo degenerativo e a perda da estabilidade celular, provocando situações adversas ao organismo e seus tecidos, favorecendo a perda da homeostasia do meio interno (OLSZEWER, 2005).

A produção desses radicais é controlada no organismo por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar, com destaque para os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os polifenóis, selênio, zinco, cobre, magnésio e os carotenoides. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células, ou seja, são capazes de bloquear o efeito danoso dos radicais livres.

Os antioxidantes são eficazes em interceptar os radicais livres, sejam eles gerados pelo metabolismo celular ou oriundos de fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular (ABRAHÃO et al., 2010). Quando há insuficiência na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo no organismo.

2.3 Gênero *Cenostigma*

Cenostigma é um gênero de árvores e arbustos nativo do Brasil, pertencente à família *Fabaceae*, a subfamília *Caesalpinioideae* e à tribo *Caesalpinieae* (LORENZI, 1998). Ocorre principalmente nos biomas de Cerrado e Caatinga. Foi descrito primeiramente por Tulasne (1843), que reconheceu a princípio três espécies estreitamente relacionadas: *C. angustifolium* Tul., *C. gardnerianum* Tul., e *C. macrophyllum* Tul. De acordo com dados da literatura, com base em estudos morfológicos como características das folhas e da vagem, entre as espécies deste gênero, discutia-se a possibilidade da existência de três a seis espécies (BENTHAM; HOOKER, 1865; ENGLER; PRANTL, 1892). Bentham em 1870, considerou *C. angustifolium* Tul. como sinonímia de *C. gardnerianum* Tul.

Em 1900, foi descrita a espécie *C. sclerophyllum*, a única do gênero de ocorrência no Paraguai, que diferia das outras por apresentar menor porte, com folhas, flores e frutos menores. Esta espécie foi posteriormente considerada como uma sinonímia de *Caesalpinia marginata* por Lewis (1998).

Em 1915, Ducke descreveu *C. tocantinum*, com folhas relativamente finas, membranosas, ponteadas e glabras, em ambas as superfícies. Seu alcance geográfico evidencia um habitat preferencial e o seu conjunto de caracteres morfológicos permite distingui-la como uma espécie distinta dentro do gênero *Cenostigma*.

Logo, ocorre na literatura grande divergência quanto à classificação das espécies deste gênero. Alguns autores ainda consideram *C. sclerophyllum* como pertencente ao gênero *Cenostigma* (ALVES, 2012), considerando o gênero com três espécies. No entanto, Warwick e Lewis (2009), com base em estudos morfológicos, evidenciam a ocorrência de apenas duas espécies, *C. macrophyllum* Tul. (sinonímia *C. gardnerianum*) e *C. tocaninum* Ducke, que estão distribuídas nas formações de mata, cerrado e caatinga das regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Em uma revisão taxonômica do gênero *Cenostigma*, Freire (1994) descreve uma variedade da espécie *C. macrophyllum*, denominada var. *acuminata* Teles Freire, onde o autor observou características morfológicas dessa espécie restritas à região de Teresina-PI.

Um estudo da anatomia foliar, com auxílio da microscopia eletrônica, na tribo Caesalpinieae descreve o padrão de distribuição das estruturas secretoras do tipo cavidade secretora interna e idioblastos, nos 47 gêneros da tribo. O gênero *Cenostigma* é citado e aparece descrito contendo quatro espécies (*C. macrophyllum*, *C. gardnerianum*, *C. tocaninum* e *C. angustifolium*) (LERSTEN; CURTIS, 1996). Os autores enfatizam que a ocorrência dessas estruturas e seu padrão de distribuição têm importância sistemática em vários níveis taxonômicos (CURTIS; LERSTEN; LEWIS, 1996) e constituem caracteres que devem ser levados em consideração na classificação das espécies vegetais. Das 210 espécies estudadas, 73 apresentaram estruturas secretoras nas folhas, sendo que apenas nove espécies mostraram a ocorrência de estruturas do tipo cavidade secretora interna. Analisando espécimes das quatro espécies do gênero *Cenostigma*, os autores afirmam que em duas aparecem a cavidade interna secretora, em *C. gardnerianum*, na qual essas estruturas aparecem abundantemente e em *C. tocaninum* que aparecem escassamente. E citam ainda, *C. macrophyllum* e *C. gardnerianum* como incomuns por apresentarem tricomas estrelados na epiderme abaxial, um tipo de tricoma visto apenas em um grupo (*Dimorphandra*) neste estudo.

Analisando os constituintes químicos isolados das folhas de *C. macrophyllum*, de uma população que anteriormente era classificada taxonomicamente como *C. gardnerianum*, Alves et al. (2012) relatam um polimorfismo químico considerável, e levantam a questão de uma reavaliação taxonômica.

Estudos como estes mostram que a classificação taxonômica quando é realizada levando em consideração apenas os caracteres morfológicos dos indivíduos pode ser contestável, e que outras abordagens como a Biologia Celular, a Química, a Biologia Molecular, entre outras, podem auxiliar em uma classificação mais precisa e menos duvidosa.

Neste contexto, a reavaliação taxonômica do gênero *Cenostigma* levando em conta diferentes abordagens se faz necessária.

2.3.1 *Cenostigma macrophyllum*

Cenostigma macrophyllum Tul. é conhecida popularmente por caneleiro, canela-de-velho, canela-de-veado, maraximbé ou fava do campo e ocorre em áreas de cerrado, cerradão, mata de galerias, caatinga, sobre solo arenoso de terra firme e em mata de transição, abundantes ao longo de estradas e aparentemente um colonizador local. Está distribuída nos estados de Rondônia, Pará, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (WARWICK; LEWIS, 2009).

Apresenta hábito arbóreo que pode atingir até 20 metros e arbustivo de 3 a 4 metros de altura. Seu caule apresenta a superfície provida de sulcos, aspecto bastante característico da espécie. Floresce predominante de janeiro a abril, embora possa ocorrer quase todo o ano, já a maturação dos frutos ocorre entre maio e julho. O fruto é um legume plano e achatado, suas sementes apresentam variações na coloração indo do marrom claro ao vinho, as flores são amarelas, discretamente perfumadas, reunidas em inflorescências piramidais, com uma pétala inferior mediana menor, lembrando uma orquídea (Figuras 1, 2 e 3). Devido a estas características, é empregada como planta ornamental, sobretudo na cidade de Teresina – PI, onde foi escolhida como a árvore símbolo da cidade (SILVA et.al., 2007; SOUSA et al., 2007). A madeira desta espécie é usada para construção, marcenarias, carvão vegetal, lenha e cercas (WARWICK; LEWIS, 2009). Há relatos na literatura de que esta espécie é usada como uma fonte alternativa de alimentação para o gado, durante as estações secas, no semiárido do nordeste brasileiro (RIBEIRO; PELACANI, 2006).

Em levantamento etnobotânico, realizado na região do semiárido piauiense, consta que a indicação popular atribui às cascas do caule, folhas e flores da *C. macrophyllum* propriedades de cura de afecções estomacais e intestinais. Dentre as propriedades comprovadas em estudos científicos estão: antiinflamatórias, analgésicas, antimicrobiana e antiulcerogênica (SOUSA et al., 2007). Os relatos da medicina popular costumam ser eficientes quando considerados no intuito de guiar a identificação de espécies vegetais potencialmente terapêuticas.

O estudo dessa espécie vem sendo realizado na Universidade Federal do Piauí (UFPI), desde 1997, pelo Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais através da avaliação das suas

propriedades farmacológicas. Trabalho este que decorre em colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da mesma instituição, responsável pela avaliação da composição química da espécie (SILVA; CHAVES; ROQUE, 1999).



Figura 1 - *Cenostigma macrophyllum* nas avenidas da cidade de Teresina-PI, utilizada como planta ornamental e para o sombreamento. Foto PAIVA, E. A. A., 2016.



Figura 2 - Diversidade de cores das sementes de *Cenostigma macrophyllum*. Foto PAIVA, E. A. A., 2016.



Figura 3 - Detalhes morfológicos da espécie *Cenostigma macrophyllum*. A. População natural no pátio do CCA-UFPI; B. Flor; C. Fruto (Vagens); D. Sementes; E. Detalhe característico do caule. Foto PAIVA, E. A. A., 2016.

2.3.1.1 Constituintes químicos de *Cenostigma macrophyllum* e seu potencial como planta medicinal

Com o propósito de realizar o estudo fitoquímico de *C. macrophyllum*, Santos (2001), descreveu o isolamento, a identificação e a determinação estrutural de metabólitos secundários presentes no extrato de folhas coletadas em plantas do campus da UFPI em Teresina/PI, o que resultou no isolamento de três triterpenóides, duas biflavonas, sendo elas a agatisflavona e a amentoflavona, um tetraflavonóide e o éster metílico do ácido mirístico. Esta investigação possibilitou indicar os principais componentes químicos responsáveis por suas bio-atividades relacionadas às indicações de uso popular. Em ensaios farmacológicos, o mesmo autor demonstrou a atividade antinociceptiva significativa e confirmou o potencial anti-inflamatório do referido extrato.

Dando sequência ao estudo fitoquímico e farmacológico da espécie *C. macrophyllum*, Costa (2005) culminou com a identificação de sete substâncias, na determinação do perfil dos ácidos graxos, tocoferóis e caroteno, constituintes do óleo das sementes da espécie, na quantificação dos fenólicos totais em seus extratos e frações e na constatação da presença das atividades antimicrobiana, antiulcerogênica e hepatoprotetora na espécie. Foram identificados três isoprenóides das cascas do fruto, o lupeol, o sitosterol e o estigmasterol e quatro biflavona das folhas, sendo a agatisfavona e a amentoflavona, que já haviam sido relatadas em trabalhos anteriores (SANTOS, 2001), e as sequoiaflavona e sotetsuflavona, que foram isoladas pela primeira vez neste trabalho.

Costa (2005), constatou que no óleo das sementes de *C. macrophyllum* há o predomínio de ácidos graxos insaturados em sua composição, sobressaindo o ácido linoléico como componente majoritário. A análise deste óleo o revelou como uma fonte abundante de tocoferóis (vitamina E) e em especial da forma biologicamente mais ativa da vitamina E, o α -tocoferol. Essa vitamina atua como um antioxidante protegendo os tecidos contra os ataques danosos (peroxidação) prevenindo o aparecimento de doenças crônicas (HADOLIN et al., 2001; DEWICK, 2003). As sementes mostraram-se ricas também em carotenos, classe de substâncias que assim como os tocoferóis é dotada de atividade antioxidante e desempenham uma importante função nutricional nos animais, uma vez que são utilizados para a síntese, através do metabolismo oxidativo, das diferentes formas ativas da vitamina A, essencial para a manutenção da visão, desenvolvimento do tecido epitelial, crescimento dos ossos, na reprodução, desenvolvimento embrionário e estimulação da função imune (DEWICK, 2003).

Têm sido postulado nos últimos anos que as substâncias antioxidantes presentes nos alimentos podem prevenir danos oxidativos a moléculas importantes como o DNA, proteínas e lipídios de membrana, tal fato aponta o óleo de *C. macrophyllum* com grande potencial para a síntese de fármacos capazes de prevenir diversas doenças crônicas, incluindo perda de visão, demência senil, câncer e doenças cardiovasculares. Há atualmente grande empenho da indústria farmacêutica destinado a identificar fatores alimentares que possam prevenir o início ou retardar a progressão de doenças relacionadas com a idade (GORETTA; CARRASQUEDO; FRAGA, 2004).

O teor de lipídios determinado nas sementes de *C. macrophyllum* foi em torno de 25% (COSTA, 2005) o que colocou a espécie juntamente com a soja (18%) e o amendoim (45%), entre as poucas espécies da família Fabaceae que apresentam grande rendimento em óleo, dado que, a média da família gira em torno de 5,5% (AKPINAR; AKPINAR; TURKOGLU, 2001).

Os extratos e frações das folhas de *C. macrophyllum* apresentam alto teor de fenólicos totais, o que pode explicar a atividade antiulcerogênica e antibacteriana desta planta (COSTA, 2005; ALVES et al., 2012). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas tanto durante o seu desenvolvimento normal quanto como em resposta a situações de estresse produzido por infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, entre outras. Enquadram-se em diversas categorias como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Nas plantas, os compostos fenólicos desempenham diferentes papéis biológicos, podem agir como fitoalexinas, dissuasivos de ingestão, atrativos para polinizadores, antioxidantes, contribuem para a pigmentação das plantas e protegem contra a radiação UV. Na indústria alimentícia, os fenólicos podem contribuir para a adstringência, cor, flavor, odor e estabilidade oxidativa dos alimentos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos são substâncias reconhecidamente possuidoras de atividade antimicrobiana (VATTEM et al., 2004). Testes feitos com o extrato etanólico das folhas de *C. macrophyllum* mostraram nítida correlação entre o conteúdo de fenóis e a potência antimicrobiana (COSTA, 2005). Para avaliar a atividade antibacteriana de *C. macrophyllum* foram escolhidas diferentes cepas da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC e MRPI98), pela sua destacada importância epidemiológica. Esta espécie é um importante patógeno humano, responsável por infecções graves devido ao seu variado conjunto de fatores de virulência, coligado ao seu diverso espectro de resistência. A avaliação revelou a presença de pronunciada atividade frente às bactérias Gram-positivas, e afirmou que os múltiplos fatores

de resistência presentes no *Staphylococcus aureus*, que contribuem para fazer desta bactéria um sério problema de saúde pública, não interferiram no mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana da espécie *C. macrophyllum*. A capacidade de impedir o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* torna o extrato etanólico das folhas do caneleiro uma alternativa para o tratamento das infecções causadas por este microrganismo (COSTA, 2005).

Carvalho (2009) ao avaliar os efeitos da Fração Hidroalcoólica (FHA) e mistura de biflavonas obtidas da folha de *C. macrophyllum* na neuropatia diabética em camundongos, comprovou que a FHA apresenta atividade inibidora da glicação proteica, efeito protetor contra o desenvolvimento da neuropatia dolorosa, efeito antinociceptivo no tratamento agudo e atividade antioxidante. No entanto, seus resultados mostram que a FHA não apresentou efeitos hipoglicemiantes. Isto indica que os efeitos observados na inibição da glicação proteica sejam devidos ao possível efeito antioxidante da FHA. Substâncias antioxidantes são descritas como inibidoras de glicação proteica, tais como, a vitamina E ou tocoferol, glutatona reduzida e os flavonoides. Tais resultados podem levar ao desenvolvimento de medicamentos para retardar a progressão dos efeitos crônicos do Diabetes Mellitus e/ou tratamento da doença, contribuindo para a melhoria da qualidade e expectativa de vida dos pacientes.

A neuropatia diabética, uma complicação crônica do Diabetes mellitus, que compromete a qualidade de vida dos indivíduos que apresentam este distúrbio metabólico, é uma importante causa de dor crônica e os tratamentos disponíveis não se mostram eficazes em aliviar a dor (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006). Piaulino (2011), considerando que estudos com plantas medicinais são interessantes como uma perspectiva futura para o tratamento da neuropatia diabética, avaliou o efeito antinociceptivo do extrato etanólico (EEtOH) e da fração acetato de etila (F.AcOEt) da casca do caule de *C. macrophyllum* em ratos diabéticos. Os resultados observados mostraram um efeito protetor no desenvolvimento da neuropatia dolorosa pelo extrato etanólico e efeito antinociceptivo no tratamento agudo pela fração acetato de etila. Entretanto, investigações futuras se fazem necessárias para avaliar a toxicidade desses extratos, bem como a sua atuação em outros mecanismos.

Fernandes (2009), avaliou a toxicidade aguda em camundongos, a citotoxicidade em eritrócito de ratos e a atividade protetora em modelos agudos de lesão gástrica da fração hidroalcoólica obtida do extrato etanólico das folhas de *C. macrophyllum*. Seus dados evidenciaram a ausência de toxicidade aguda em camundongos e ausência de citotoxicidade em eritrócitos de ratos. O extrato etanólico exibiu atividade gastroprotetora contra lesões

induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado. Viana et al. (2013), utilizando vários modelos experimentais de lesão gástrica para investigar a toxicidade aguda da fração hidroalcoólica das folhas de *C. macrophyllum* (Cm-FHA) e seu possível mecanismo de ação, relataram que o estudo toxicológico oral não revelou quaisquer efeitos tóxicos, resultados estes, que indicam um perfil de segurança para o uso terapêutico via oral do Cm-FHA.

Objetivando investigar possíveis efeitos tóxicos do extrato etanólico das folhas de *C. macrophyllum* sobre parâmetros reprodutivos e histopatológicos em ratas, Santos (2009), avaliou possíveis interferências do extrato sobre a toxicidade reprodutiva de ratas (ADAMS, 1995), quanto à fertilidade, implantação do ovo, desenvolvimento do embrião e do feto, abortamento e número de nascidos vivos e analisou histopatologicamente o efeito do extrato do material vegetal sobre coração, fígado e rins das ratas. As análises dos seus resultados mostraram ausência de toxicidade.

Coelho et al. (2014), ao investigar a eficácia de uma emulsão de óleo-água de *C. macrophyllum*, no reparo de feridas de ratos diabéticos, observou efeitos benéficos. A emulsão feita com o óleo das sementes de *C. macrophyllum* mostrou uma influencia significativa sobre a cicatrização de feridas na pele de ratos diabéticos. Os resultados obtidos indicaram que a emulsão óleo-água acelerou o processo de reparo tecidual, aumentando a deposição de fibras de colágeno, uma proteína que desempenha papel importante em tecidos biológicos. Esta atuação se deve aos componentes químicos presentes no óleo da semente de *C. macrophyllum* como flavonoides, tocoferol, esteroides e β -caroteno, que estão associadas à aceleração da cura de feridas decorrentes do diabetes, comprovando a ação desta planta medicinal na formação de fibras de colágeno e ação anti-inflamatória e seu potencial farmacológico promissor.

Estudos realizados com populações nativas de caneleiro da Caatinga da Bahia, no nordeste brasileiro, que foram classificadas como *C. gardnerianum* Tul. pelo sistema taxonômico antigo, demonstraram a existência de polimorfismo nas características químicas. O extrato metanólico rico em fenóis extraído da casca do caule, submetido às técnicas cromatográficas, revelou o ácido gálico além da bergenina, como componente majoritário. Enquanto que do extrato das folhas foram isolados além do ácido gálico, o metil galato, o ácido elágico, a quercetina, a quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo, a quercetina-3-O-(6'' - O-galloyl)- β -D-glicopiranosídeo, a quercetina-3-O-(6'' -O-E-p-coumaroyl)- β -D-glicopiranosídeo, a agatisflavona e a vitexina (ALVES et al., 2012).

Este trabalho consiste no primeiro relato da bergenina apresentando atividade analgésica em ratos. Além da bergenina, o ácido gálico presente no extrato da casca do caule,

é também um composto que apresenta efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e atividade antioxidante. Os autores ressaltam a importância de uma reavaliação taxonômica da espécie *C. macrophyllum* em função do polimorfismo encontrado quanto à constituição química nesta população (ALVES et al., 2012), se comparado aos estudos fitoquímicos realizados com populações de Teresina-PI (SOUSA et al., 2007; SILVA et al., 2007; PIAULINO et al., 2013; VIANA et al., 2013; COELHO et al., 2014).

2.3.2 *Cenostigma tocantinum*

Cenostigma tocantinum Ducke é uma espécie nativa da Amazônia, conhecida popularmente por pau-preto, pau-prezinho, inharé, cássia-rodiviária e mangiribá. Sua ocorrência é mais restrita que *C. macrophyllum*, abrangendo apenas a região Norte do Brasil, nos estados Amazonas, Pará e Tocantins, sendo comumente encontrada em levantamentos ecológicos. Há relatos na literatura de espécimes cultivados no Jardim Botânico no Rio de Janeiro (WARWICK; LEWIS, 2009). Ocorre em florestas primárias, em altas florestas de terra firme, em florestas sazonalmente inundadas e não inundadas, e em solo arenoso. Sua madeira é utilizada na construção civil e a árvore para ornamentação, arborização urbana e reflorestamento.

Essa espécie tem hábito arbustivo (3 m), arbóreo (8-35 m) (Figura 4) e apresenta copas densas e troncos torcidos ou tortuosos, com profundos sulcos longitudinais irregulares. A casca tem coloração marrom e nos galhos imaturos é castanho-acinzentada, sulcada, lenticelada e com superfície frequentemente descascando, tornando-se brilhante e glabra na maturidade (WARWICK; LEWIS, 2009).

Nos últimos anos, seu potencial para a arborização tem sido mais explorado, devido aos seus aspectos favoráveis como tronco reto, crescimento rápido, copa frondosa, que proporciona sombreamento eficiente e sem liberação de grande quantidade de folhas, sistema radicular pouco agressivo, além da beleza de sua floração. Por ser nativa, apresenta baixa suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças. Tais características tornam a espécie atrativa para o plantio na arborização urbana (BEZERRA; SALOMÃO, 2005; GARCIA; MORAES; LIMA, 2008). No entanto, ainda faltam estudos sobre os aspectos silviculturais relacionados ao seu comportamento, crescimento, desenvolvimento e condições adequadas.



Figura 4 – Pau-Preitinho (*C. tocanthum* Ducke) na arborização urbana de Manaus-AM. Foto Silas Garcia A. Sousa (2014).

Estudos sobre a diversidade genética das populações de *C. tocanthum* também são escassos. Almeida et al. (2016), com o intuito de estudar a diversidade genética de populações de *C. tocanthum* em áreas urbanas de cidades do estado do Amazonas, por meio de marcadores moleculares AFLP, coletou amostras de três populações. De acordo com os autores, conhecer a diversidade genética de populações de *C. tocanthum* de áreas urbanas é importante porque muitas vezes estas se tornam matrizes alvo de coleta de sementes para uso em outros projetos de arborização e para o plantio realizado pelos próprios moradores das cidades. E enfatiza que a coleta realizada em poucos genótipos ou genótipos aparentados pode facilitar a redução da base genética dos plantios. Lins, Farias Neto e Muller (2003), recomendam maior diversidade de genótipos em plantios, o que evitaria a vulnerabilidade genética à doenças, à pragas e à condições edafo-climáticas adversas.

As estratégias de manejo e conservação das espécies devem observar a variabilidade genética encontrada em suas populações, visando garantir a preservação de seus recursos genéticos. Para a conservação da espécie *C. tocanthum*, deve-se considerar o seu padrão de variabilidade genética, sendo necessário para isso uma amostragem representativa do conjunto de genes e alelos contidos nos indivíduos de cada população. Os resultados encontrados por Almeida et al. (2016), estão de acordo com os apresentados na literatura para populações naturais de espécies arbóreas tropicais, que mostram que em geral a maior parte da

diversidade genética encontra-se dentro das populações. Os marcadores do tipo AFLP revelaram alto conteúdo de informação genética em *C. tocaninum*, que podem ser úteis nas análises genéticas que buscam obter informações para a sustentabilidade genética e o manejo florestal da espécie.

Não há estudos conclusivos do sistema reprodutivo de *C. tocaninum*, no entanto, a distribuição da sua variabilidade genética é semelhante às espécies florestais alógamas tropicais, e existindo suspeita de alogamia, a amostragem de sementes de plantas vizinhas poderia conduzir à obtenção de plantas de indivíduos aparentados, o que pode levar ao efeito da endogamia. Para a coleta de sementes visando os projetos de arborização, deve-se buscar amostrar diferentes plantas matrizes, pois existe a probabilidade das sementes serem resultantes de acasalamentos endogâmicos e assim resultar em menor potencial genético dos descendentes. Com uma amostragem adequada na população natural, os projetos de arborização irão colaborar com a conservação *in situ* da espécie (ALMEIDA et al., 2016).

Garcia et al. (2008), determinou o grau crítico de umidade para as sementes de *C. tocaninum*, que situa-se abaixo de 5,8% de água e ressalta que, as sementes mesmo após passar pelo estresse de 96 horas de secagem, atingindo 5,8% de umidade, ainda permaneceram viáveis com germinação superior a 90%. Com este fato, pôde-se constatar que tais sementes podem ser classificadas como ortodoxas, considerando que toleram a dessecação em níveis muito baixos de umidade. De acordo com Ramalho et al. (2012), sementes ortodoxas são aquelas que podem ser dessecadas a baixos teores de umidade (4% a 6%) e armazenadas por longos períodos em câmaras frias, em embalagens herméticas, sem contudo, perder a capacidade germinativa.

Neste contexto, além da conservação *in situ* para *C. tocaninum*, a conservação *ex situ* através de banco de sementes pode ser uma boa opção. Conhecer o comportamento da semente é importante, pois permite definir os métodos e as estratégias de conservação da espécie em estudo. O armazenamento de sementes sob condições de baixa temperatura e baixo teor de água constitui uma das técnicas mais eficientes para a conservação de recursos genéticos de plantas por médio e longo prazo, sendo considerado procedimento padrão para a maior parte dos bancos de germoplasma (ROBERTS, 1973).

Diante da devastação das florestas tropicais, causadas pela demanda humana de recursos florestais e produção de alimentos, a efetiva conservação de espécies arbóreas nativas é de extrema importância. Neste contexto, as estratégias de conservação devem ser bem delineadas e aliadas umas às outras. Por exemplo, a conservação *in situ* de certa forma é mais interessante por manter a biodiversidade e suas relações num ecossistema como um

todo, no entanto, aliada à conservação *ex situ* se torna uma ferramenta poderosa na conservação da variabilidade genética das espécies florestais tropicais.

O objetivo da conservação da variabilidade genética é a manutenção do potencial evolutivo das espécies, uma vez que esta variabilidade é condição essencial para a adaptação às mudanças ambientais. Quando a variabilidade se faz presente, as chances de uma espécie resistir a qualquer pressão que o meio imponha são bem maiores, isso garante a sua sobrevivência e é importante para a persistência evolutiva das espécies. A redução da variabilidade genética restringe o potencial de ajustes genéticos a mudanças do ambiente, sejam elas naturais, econômicas ou sociais (FIGLIOLIA; OLIVEIRA; PIÑA-RODRIGUES, 1993).

2.4 Conservação de espécies arbóreas nativas

Para que os programas de conservação e melhoramento genético das espécies arbóreas obtenham êxito é fundamental que se conheça a variabilidade genética existente nas suas populações naturais. Este conhecimento possibilitará a adoção de estratégias efetivas de manejo que visem à conservação das populações. Uma população pode ser definida, do ponto de vista da Genética de Populações, como um conjunto de indivíduos da mesma espécie, que ocupa o mesmo local, apresenta continuidade no tempo e cujos indivíduos possuem a capacidade de se acasarem ao acaso, e por tanto, de trocar alelos entre si (RAMALHO et al., 2012).

Com o intuito de elaborar e executar de forma eficiente os programas de conservação de recursos naturais, é preciso que parâmetros pertinentes a cada espécie sejam considerados, como por exemplo, informações ecológicas referentes ao padrão de distribuição, a estrutura genética das suas populações, o grau de erosão genética e quais são os fatores determinantes da variação genética da espécie em questão, além de compreender como esta variabilidade se distribui entre e dentro das populações. Informações como estas devem ser obtidas de forma a prevenir a extinção de populações naturais de espécies arbóreas.

A variabilidade genética devido a diferenças alélicas pode ocorrer em diferentes níveis, como, de espécies dentro de ecossistemas, de populações dentro de espécies e de indivíduos dentro de populações de espécies. O planejamento de estratégias de conservação genética requer a caracterização destes níveis de diversidade. O estudo da variabilidade genética em populações naturais envolve duas compreensões básicas, sendo que a primeira

consiste em descrever os níveis de variabilidade genética que é mantida dentro das populações de uma determinada espécie e a segunda, de particular importância para a conservação genética, consiste em conhecer como essa variabilidade se distribui entre e dentro das populações (KAGEYAMA, 1987; DIAS; KAGEYAMA, 1991).

O conhecimento a respeito da biologia e ecologia das espécies também deve ser levado em consideração nos programas de conservação, uma vez que propiciam informações sobre os padrões populacionais, como distribuição da diversidade genética, fluxo gênico, taxas de cruzamentos. Informações como estas são relevantes já que o potencial genético das espécies é primordial para a sua evolução (HAMRICK et al., 1992; HAMRICK; MURAWSKY, 1990). Hamrick (1983), estudando populações naturais de espécies arbóreas, já concluía que a variabilidade entre e dentro de populações é afetada diretamente pelo sistema de reprodução da espécie, pelo seu mecanismo de dispersão de sementes, além do tamanho efetivo da população, da sua distribuição geográfica e do tipo de comunidade em que a espécie normalmente ocorre.

A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da biologia da conservação, já que é ela que fornece o potencial adaptativo/evolutivo de uma espécie. Dentro deste contexto, as técnicas da biologia molecular podem ser empregadas para a obtenção de informações sobre aspectos genéticos das espécies vegetais, em especial, os marcadores moleculares, visto que, constituem uma importante ferramenta para descrever os padrões de variabilidade genética de uma população natural e entre populações naturais, fornecendo assim subsídios para a elaboração das estratégias de conservação.

Antes da década de 70, a floresta tropical era considerada como um recurso auto renovável, hoje sabemos o quão errônea é esta afirmativa. A decorrente fragmentação e degradação dos ecossistemas florestais são consideradas um dos maiores problemas ambientais do mundo (LAURANCE; LOVEJOY, 2002; LAURANCE; STOUFFER; LAURANCE, 2004). A ocupação de áreas naturais para a expansão urbana, industrial e para exploração agropecuária leva a uma constante fragmentação dos biomas naturais resultando na perda da variabilidade genética. Esta fragmentação traz preocupações, uma vez que altera a estruturação das populações comprometendo a utilização dos recursos naturais (BARBOSA; MANTOVANI, 2000).

Um ponto que deve ser considerado na conservação e manutenção da diversidade genética de uma espécie é o fato de saber se a estruturação genética encontrada é uma característica natural da espécie estudada ou se é resultado da presença de barreiras físicas

causadas pelo homem, como no caso de fragmentação de um habitat. Este conhecimento poderá nortear as ações de manejo e conservação.

A estruturação genética de uma espécie no espaço e no tempo é resultante da ação de forças evolutivas, tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética. Dentre esses fatores, as mutações e as migrações tendem a aumentar a variabilidade genética, enquanto que a seleção e a deriva podem ocasionar a diminuição da variabilidade genética dentro das populações (FELSENSTEIN, 2005).

Entre os fatores que podem alterar a frequência de certos alelos, causando a formação de grupos divergentes dentro das populações, estão a endogamia, a deriva genética e a seleção. Em contrapartida, a presença de fluxo gênico pode equilibrar esta diferenciação, visto que espécies com acentuada movimentação de pólen e sementes têm menor diferenciação genética entre populações do que espécies com fluxo genético restrito (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Nas espécies arbóreas, na maior parte dos casos, observa-se uma alta variabilidade genética dentro das populações e baixa entre elas (COLLEVATTI et al., 2001; LEMES et al., 2003; NOVICK et al., 2003). No entanto, isso é esperado para espécies de plantas com grande número de indivíduos com mais de um sistema de reprodução e com a presença de eficientes mecanismos de dispersão de pólen e sementes. Já para espécies com baixo N populacional, que apresente reprodução vegetativa, autofecundação e limitada dispersão de pólen e sementes, o que se espera é uma baixa diversidade dentro e alta entre as populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

2.5 Genoma Cloroplastídico

A célula vegetal possui genomas de origem nuclear, mitocondrial (DNAm) e cloroplastídico (DNAcp). Cloroplastos, assim como as mitocôndrias, são organelas citoplasmáticas que possuem material genético próprio. Sua origem endossimbiótica é comprovada pela presença de um maior número de características similares ao genoma procarionte do que ao genoma nuclear eucariótico, como o fato do seu DNA estar contido em uma única molécula circular, altamente helicoidizada e não ter proteínas histonas associadas. Essa teoria indica que os cloroplastos evoluíram de ancestrais eubacterianos há mais de um bilhão de anos, entretanto a sua organização gênica evidencia que ocorre uma mistura de características eubacterianas, eucarióticas e únicas (PIERCE, 2011).

A maioria dos genomas de cloroplastos varia de 120.000 a 160.000 pb que codificam polipeptídeos usados pela organela, bem como rRNAs e tRNAs necessários para a tradução de suas proteínas. A replicação, transcrição e tradução dos seus genes são similares em muitos aspectos a esses processos em eubactérias. A maioria dos genes no DNACp é transcrita em grupos tipo óperons originando mRNA policistrônico e poucos genes têm seus próprios promotores, que são praticamente idênticos aos encontrados em eubactérias com sequências de consenso -10 e -35 muito similares. A maior parte do DNACp consiste em sequências não codificantes e muitos genes apresentam íntrons (GRIFFITHS et al., 2013).

O genoma do cloroplasto codifica em torno de 100 proteínas, que estão envolvidas na formação dos complexos proteicos responsáveis pela fotossíntese (SUGITA; SUGIURA, 1996). No entanto, estima-se que o cloroplasto contenha de 2000 a 5000 proteínas diferentes, sendo a maioria delas codificadas pelo genoma nuclear (PELTIER et al., 2000). Como uma organela semiautônoma, a dupla localização dos genes fotossintéticos gera um maior custo para a regulação da expressão gênica nas células vegetais. Estudos evidenciaram que as proteínas localizadas no centro de reação de cada fotossistema são codificadas pelo próprio genoma cloroplastídico, enquanto que as proteínas periféricas são provenientes do genoma nuclear (PFANNSCHIMDT et al., 2003). A RuBisCo (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase) é uma proteína importante e complexa que participa da fixação de carbono da fotossíntese e é formada por oito subunidades pequenas idênticas e oito subunidades grandes idênticas. A subunidade menor é codificada pelo genoma nuclear, enquanto que a subunidade maior é codificada pelo DNA do cloroplasto (PIERCE, 2011).

2. 6 Extração de DNA em plantas

A extração de DNA em plantas superiores, além de dispendiosa e laboriosa, é dificultada pela presença dos compostos secundários, oriundos do seu metabolismo e liberados durante a lise celular. Os polissacarídeos e os polifenóis apresentam atividade inibidora da reação de PCR, se ligam à molécula de DNA e impedem que enzimas como a *Taq* polimerase e endonucleases de restrição atuem, comprometendo a qualidade do DNA extraído. Para contornar a interferência desses componentes celulares, geralmente, os protocolos utilizam reagentes tóxicos, como o clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e β -mercaptoetanol, que atuam como antioxidantes e se ligam a esses compostos precipitando-os, deixando assim o DNA livre para ação de enzimas na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

e enzimas de restrição. Além de impedir o acesso de enzimas à molécula de DNA, a contaminação por compostos fenólicos, por exemplo, leva a oxidação das amostras e conseqüentemente a sua degradação (DELLAPORTA; WOOD; HICKS, 1983; SAHA; CALLAHAN; CREECH, 1997).

Um passo fundamental para se obter sucesso nos estudos moleculares em plantas, sejam os que visem a caracterização da diversidade genética de uma dada espécie ou qualquer outra aplicação molecular, consiste no isolamento e purificação de quantidade suficiente de DNA de boa qualidade. Na prática, o que se busca é estabelecer protocolos que possibilitem a obtenção de DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida, eficiente e acessível, visto que na maioria das vezes estes estudos envolvem grande número de amostras. Os protocolos de extração devem evitar a degradação do DNA, eliminar os polissacarídeos que inibem a ação das enzimas e eliminar substâncias fenólicas ou outros compostos secundários que possam danificar o DNA.

Como as composições dos metabólitos secundários variam entre espécies nos vegetais, é comum que para cada espécie um determinado protocolo de extração de DNA sofra alguns ajustes e modificações, visando resolver problemas específicos. A grande maioria dos protocolos descritos na literatura, para a extração de DNA em plantas, derivam do protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) padrão, descrito por Doyle & Doyle, em 1987a,b , que utiliza o brometo de cetiltrimetilamônio como detergente catiônico para solubilizar as membranas lipoproteicas das células (CLARKE; MORAN; APPELS, 1989; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

O tecido preferencialmente utilizado para a extração de DNA em plantas é o tecido foliar jovem, pois além de conter poucos metabólitos secundários, apresenta grande número de células em divisão e, conseqüentemente, mais DNA. O tecido foliar pode ser utilizado fresco ou desidratado (seco). As vantagens de se usar tecido seco em estudos moleculares é o fato de ele poder ser rompido com mais facilidade, o que favorece a etapa de maceração e a qualidade do DNA em geral é satisfatória, além disso, no estado desidratado o DNA é menos suscetível à degradação química ou enzimática (MURRAY; THOMPSON, 1980). Entretanto, a coleta de folhas jovens nem sempre é possível, principalmente para espécies arbóreas em populações naturais, que podem atingir vários metros de altura. Diante do exposto, buscar fontes alternativas de DNA de boa qualidade, em plantas, para o emprego de estudos moleculares é essencial.

Silva (2010) testou um procedimento modificado baseado no protocolo CTAB para extrair DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do Cerrado, no qual

avaliou diferentes concentrações de β -mercaptoetanol no tampão de extração. Seus resultados sugeriram que com altas concentrações de β -mercaptoetanol (1% a 5%) no tampão de extração pode se obter DNA de boa qualidade para análises posteriores, como amplificação em PCR e digestão com enzimas de restrição. A autora salienta que os melhores resultados foram obtidos com concentrações cinco vezes maiores que a concentração recomendada no protocolo original.

Coleções de herbário são consideradas fontes potencialmente importantes de material para estudos filogenéticos, todavia DNA de amostras históricas é difícil de extrair, raramente os extratos são de boa qualidade. Drábková, Kirschner e Vlcek (2002), avaliaram sete protocolos de extração de DNA, em espécimes de herbário de *Juncus* de várias idades. Os melhores resultados obtidos exigiram boa maceração do material e maior tempo de precipitação. Nessas condições, o Kit DNeasy Plant (Qiagen) e o método CTAB modificado forneceram boa quantidade de DNA. Taylor e Swann (1994) ressaltam que se o material destinado ao herbário for seco ao ar na temperatura de 42°C, antes de ser estocado, pode conter quantidade útil de DNA de alto peso molecular, e afirmam que a secagem ao ar é melhor que a conservação do material em sílica gel.

Na tentativa de buscar fontes alternativas de DNA para futuros estudos moleculares em *Plinia cauliflora*, Danner et al. (2011) analisaram diferentes tecidos vegetais, bem como sua forma de coleta e acondicionamento, na tentativa de evitar os problemas causados pelos contaminantes. Além de folhas, foram coletados também o câmbio do caule e pecíolos foliares. Observou-se que o câmbio do caule escurece rapidamente, certamente por conta da oxidação causada pelos compostos fenólicos. Essa oxidação pode ser evitada, colocando o câmbio em tampão CTAB (2%), imediatamente após a coleta. O câmbio do caule e pecíolo foliar renderam uma quantidade menor de DNA que as folhas, no entanto, quantidade suficiente para utilização das amostras em ampliações em PCR subsequente.

O fato de restringir o tecido foliar jovem como principal fonte de DNA de qualidade nas plantas, delimita as possibilidades de extração. Ter em outros tecidos a fonte de DNA de alto peso molecular amplia a perspectiva de sucesso nos estudos moleculares. Utilizar outras partes das plantas como, câmbio do caule, pecíolo foliar, sementes, ou até mesmo folhas maduras ou velhas facilitaria e muito a etapa de coleta do material vegetal.

Gupta et al. (2012), diante da necessidade de determinar a pureza genética de lotes de sementes de interesse agrônômico, propuseram um protocolo simples, rápido, eficiente e de baixo custo para extrair DNA. Neste caso, especificamente, extrair DNA de sementes implicaria em economia de tempo e dinheiro, pois evitaria a obrigatoriedade de testes de

campo que são demorados, trabalhosos e requerem grandes áreas. Alguns ajustes nos protocolos que utilizam o SDS (Dodecil sulfato de sódio) ou o CTAB como detergente, viabilizaram essa alternativa. Sementes de mostarda indiana, arroz, trigo e algodão foram colocadas de molho *overnight* para facilitar a maceração, a quantidade e qualidade do DNA extraído foram suficientes para os estudos moleculares posteriores. Os autores ressaltam a utilidade deste método para sementes de outras espécies.

Acrocomia aculeata é uma palmeira da família das Arecaceae encontrada no Brasil, por ser oleaginosa é bastante promissora para a produção sustentável de energia renovável, especialmente biodiesel. A Biologia Molecular é uma ferramenta importante para caracterização da diversidade genética, uma vez que pode conduzir estudos de conservação de germoplasma. A obtenção de amostras de tecido foliar para extração de DNA nessa espécie é um problema, devido a sua altura que pode chegar a 20 metros. Uma alternativa para driblar esse obstáculo e realizar uma amostragem eficaz das populações seria a coleta do caule, denominado estipe, para este tipo de árvore. Lanes et al. (2013), padronizaram um protocolo para extração de DNA de folhas frescas, folhas liofilizadas e para estipe. O método proposto foi baseado no protocolo CTAB, porém de forma menos laboriosa e mais segura porque eliminou o β -mercaptoetanol, substância volátil e tóxica que requer muito cuidado ao ser manuseada. O estipe se mostrou uma boa fonte de DNA para estudos moleculares devido a sua acessibilidade. A liofilização é um mecanismo útil quando o número de amostras é grande e ainda permite o armazenamento das amostras durante um longo período de tempo.

Sousa et al. (2014), com o objetivo de comparar vários métodos de extração de DNA para folhas de *Caesalpinia ferrea* testou quatro protocolos baseados no detergente CTAB, Doyle e Doyle (1987), Clarke, Moran e Appels (1989), Ferreira e Grattapaglia (1998) e Romano e Brasileiro (1999), comparando-os com o kit comercial (Invisorb Spin Plant Mini Kit, Invitek, Berlin, Germany). Usando primers de RAPD para o teste de amplificação em PCR, as únicas amostras que amplificaram foram as extraídas com o kit comercial, embora os protocolos publicados por Ferreira e Grattapaglia (1998) e Romano e Brasileiro (1999) tivessem produzido maior concentração de DNA de boa qualidade, segundo quantificação em gel de agarose 0,8%. *Caesalpinia férrea* pertence à *Caesalpinioideae*, subfamília das Fabaceae conhecida por conter grande quantidade de compostos secundários, podendo esses terem sido os responsáveis por inibir a PCR.

Sem êxito na extração de DNA de *Jatropha curcas*, com os protocolos descritos na literatura devido à presença dos compostos secundários, Pamidimarri et al. (2009) desenvolveram um método simplificado, de baixo custo e confiável, modificando o protocolo

CTAB. As modificações, consideradas importantes, incluíram a utilização de 3,5M NaCl no tampão de extração, Tris fenol saturado durante a purificação, 80% de etanol e 2,0M de NaCl (concentração final) durante a precipitação, executando todos os passos em temperatura ambiente. O DNA extraído de folhas jovens que pôde ser eficientemente digerido por endonucleases de restrição, se mostrou adequado para ampliações por PCR, bem como na utilização de técnicas moleculares para estudos de diversidade genética.

Diante da necessidade urgente de um protocolo simples e rápido que permitisse a execução de centenas de amostras em um dia de trabalho, Kotchoni e Gachomo (2009) descreveram um método prático, livre da utilização de reagentes tóxicos. De uma maneira simples, tanto em termos de reagentes quanto em equipamentos necessários, o tempo de extração foi reduzido drasticamente, eliminando o uso de nitrogênio líquido, de recipientes com gelo, β -mercaptoetanol, clorofórmio: álcool isoamílico, porém garantindo no final, DNA genômico de boa qualidade. Testes foram feitos com *Arabidopsis thaliana*, da qual folhas frescas foram submetidas à extração imediatamente após a coleta com tampão contendo apenas SDS-NaCl. Para a precipitação foram utilizados apenas uma centrífuga e isopropanol. As amostras obtidas foram passíveis de digestão com enzimas de restrição e amplificação na PCR, certificando que o método foi eficiente ao precipitar as substâncias interferentes.

Moreira e Oliveira (2011) relataram o efeito da idade da folha na extração de DNA de *Dimorphandra mollis*, uma espécie arbórea do Cerrado brasileiro, conhecida por suas propriedades farmacológicas. Seguindo o protocolo CTAB padrão de Doyle e Doyle (1987b), folhas jovens e folhas velhas foram submetidas à extração. A quantificação em gel de agarose 0,8% revelou a ausência de DNA nas amostras referentes às folhas velhas, o que segundo os autores se deve ao fato dessas folhas acumularem metabólitos químicos que são importantes para sua própria defesa contra insetos herbívoros. Estes metabólitos, constituídos por compostos fenólicos oxidam o DNA de maneira irreversível, degradando-o, o que impede a sua posterior amplificação por PCR, pela inibição da enzima *Taq-polimerase*. A amplificação por PCR com o DNA das folhas jovens de *D. mollis* foi bem sucedida com *primers* de RAPD.

2.7 Marcadores Moleculares para estudos de estrutura genética e filogeografia de plantas

O polimorfismo de sequências de DNA e de proteínas revela dados sobre a variabilidade genética intra e interpopulacional, que são significativos para que se possam alcançar as metas postuladas pela biologia da conservação, como a descrição da estrutura

populacional com a finalidade de identificar unidades de conservação (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002).

Os marcadores moleculares altamente polimórficos e com altas taxas de mutação são bastante pertinentes para estudos populacionais e filogeográficos (LEMES et al., 2003; NOVICH et al., 2003). As sequências de regiões não codificantes e os microssatélites estão entre os mais utilizados. Entretanto, marcadores que apresentem taxas evolutivas e padrões de herança distintos, contribuem para a obtenção de informações destinadas a elucidação de dados de estrutura genética e história evolutiva das espécies (SCHAAL et al., 1998). Para as plantas, marcadores moleculares provenientes do genoma cloroplastídico estão entre os mais propícios para estudos de filogenia (LORENZ-LEMKE et al., 2005; MILLER; SCHAAL, 2005).

As sequências de DNACp evoluem lentamente se comparadas com as sequências do DNA nuclear, tanto de plantas como de animais e alguns DNAMt, por isso, vêm sendo empregadas com frequência em estudos de filogenia por conta da sua estabilidade estrutural, seu padrão de herança uniparental e sua taxa de mutação. Apesar de ser um genoma conservado em sua evolução, sua variação intraespecífica tem sido relatada em muitas espécies. Isso permite reconstruir a filogenia a nível intraespecífico e inferir rotas históricas de colonização, como consequência de sua herança materna na maioria das angiospermas (FUJII et al., 1997; 1999; 2002; NEWTON et al., 1999). A variação no DNACp pode ser observada dentro de uma área relativamente restrita e assim proporcionar a oportunidade de compreender as diferenças filogenéticas entre populações dentro de uma escala geográfica (HONJO et al., 2004).

O genoma mitocondrial (DNAMt) das plantas apresenta características semelhantes ao do genoma cloroplastídico (DNACp) pois, além da herança uniparental, a taxa de substituições de bases também é baixa. Contudo, o DNAMt não é muito utilizado para estudos de filogenia, devido a sua taxa de mutação ser bem menor do que o DNACp, sendo dessa forma, mais difícil identificar polimorfismos neste genoma.

Estudos filogeográficos têm sido importantes na investigação do efeito das mudanças climáticas do passado, sobre a estrutura genética das espécies animais e vegetais. Esses estudos são fundamentais, pois permitem fazer inferências sobre a evolução das espécies dentro dos biomas e auxiliam no planejamento de estratégias de conservação. Há na literatura uma prevalência de estudos filogeográficos de plantas baseado na variação encontrada no genoma plastidial, que apresenta herança materna na maioria das angiospermas. O fluxo gênico herdado maternalmente ocorre por meio da dispersão das sementes, sendo neste caso,

mais restrito do que os genes nucleares que apresentam herança biparental e dispersão por gametas (ENNOS, 1994). Estudos da estrutura genética de populações de espécies angiospermas caracterizadas tanto pelo DNA nuclear quanto plastidial, revelaram que a variação no DNACp está espacialmente mais estruturada do que a variação nuclear.

Um estudo sobre a estrutura filogeográfica de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae), uma espécie arbórea endêmica do Cerrado brasileiro, com o intuito de compreender os processos que levaram a sua atual estrutura genética espacial, deu enfoque à sequência de DNACp não codificante (*psbC-trnS*). As análises permitiram concluir que as mudanças climáticas no Quaternário ajudaram a moldar a sua distribuição e a sua estrutura genética encontrada no presente (RAMOS et al., 2007).

Avanços consideráveis foram alcançados com relação à compreensão dos padrões biogeográficos em todo o mundo. Entretanto, poucos estudos têm abordado a questão filogeográfica das espécies do Cerrado, um dos biomas mais ricos em biodiversidade do mundo, que continua pouco estudado. O Cerrado é a savana mais rica do mundo, especialmente em número de espécies vegetais presentes, apresenta alto índice de endemismo e muitas espécies adaptadas às condições de estresse (MYERS et al., 2000). Sua área original foi reduzida em mais de 50% nos últimos anos, tornando-se então um dos principais *hotspots* globais para a conservação da biodiversidade (KLINK; MACHADO, 2005; PENNINGTON; RATTER; LEWIS, 2006; WERNECK, 2011).

O Cerrado envolve uma biota altamente heterogênea, tanto que alguns estudos o dividiram em províncias biogeográficas (SCARIOT; SOUSA-SILVA; FELFILI, 2005; FIASCHI; PIRANI, 2009). Novaes et al. (2010), estudando diferentes populações de *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae), uma árvore endêmica e adaptada às regiões mais frias do Cerrado, com o objetivo de investigar a estrutura filogenética e de verificar a sua concordância com os padrões filogeográficos e biogeográficos descritos até então, utilizaram uma sequência de íntron do DNA plastidial e uma sequência do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal nuclear (ITS). Os autores observaram um elevado nível de diferenciação entre as populações, o que já foi relatado também para outras espécies (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001, 2003; NOVAES et al., 2010; RAMOS et al., 2007) e concluem que a distribuição heterogênea da diversidade genética de *Dalbergia miscolobium* está de acordo com a heterogeneidade comumente relatada, em termos de distribuição de espécies, no bioma do Cerrado.

Os autores Fiaschi e Pirani (2009), reforçam a importância de tratar as diferentes províncias do Cerrado, como diferentes conjuntos de biodiversidade, diante da ocorrência

generalizada de haplótipos exclusivos nas diferentes populações estudadas e levantam questionamentos como: será que esses padrões biogeográficos ocorrem em outras espécies difundidas no Cerrado? Como as diferenças ecológicas e os fatores históricos levaram à diversificação da biota do Cerrado? A filogeografia do Cerrado ainda está no seu início e muitos estudos serão necessários para que possamos compreender a sua biogeografia tão rica, porém ameaçada, e assim explorá-la de maneira sustentável contribuindo para a sua conservação.

Com o objetivo de reunir informações sobre a filogeografia intraespecífica para uso em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção no Japão, foram analisadas a variação em sequências não codificantes de DNACp da espécie *Primula sieboldii* (Primulaceae), coletadas em regiões geograficamente distantes. Para este estudo, a análise de variância molecular mostrou que 59,9% do total da variação existente ocorre entre as regiões; 32,5% da variabilidade ocorre entre as populações dentro das regiões e 7,6% dentro das populações. Com o estudo, pode-se concluir que para a conservação genética dessa espécie, o transporte de plantas entre as regiões deve ser evitado, a fim de conservar as características genéticas das populações locais (HONJO et al., 2004).

Com o propósito de examinar as relações entre as espécies do gênero *Hoffmannseggia* (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae), Simpson, Tate e Weeks (2004), utilizaram dados moleculares da região espaçadora ITS nuclear, região codificante do DNACp (*rbcL*) e região de intron de DNACp (*trnL*), para averiguar as evidências da ocorrência de evolução reticulada, devido à hibridação interespecífica, e padrões de caráter evolutivo característicos do gênero.

Com base em análises de dados de sequências de três regiões do DNACp (*trnL-F*, *rbcL* e *rps16*) Haston, Lewis e Hawkins (2005) fizeram uma reavaliação filogenética do grupo *Peltophorum* (Caesalpinieae: Leguminosae) com o objetivo de esclarecer sua origem monofilética ou parafilética e assim, determinar as relações entre os gêneros do grupo. Apoiado nos resultados, os autores apresentaram uma proposta para a reclassificação do grupo *Peltophorum*.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 414-420, 2010.
- ADAMS, N. R. Detection of effects of phytoestrogens on sheep and cattle. **Journal of Animal Science**. v. 73, p. 1509-1515, 1995.
- AKPINAR, N.; AKPINAR, M. A.; TURKOGLU, S. Total lipid content and fatty acid composition of the seeds of some *Vicia L.* species. **Food Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 449-453, 2001.
- ALMEIDA, F. V.; LOPES, M. T. G.; VALENTE, M. S. F.; BENTES, J. L. S. Genetic diversity among and within populations of *Cenostigma tocantinum* Ducke. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 108, p. 753-762, 2016.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; VILLAREAL, C. F.; SOARES, M. B. P.; QUEIROZ, L. P.; AGUIAR, R. M. Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (LEGUMINOSAE). **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1137-1140, 2012.
- ALVES, C. Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum***. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal da Bahia, Salvador: UFB, 202 p. 2012.
- AMORIM, L. D. M de.; SOUSA, L. O. F.; OLIVEIRA, F. F. M.; CAMACHO, R. G. V.; MELO, J. I. M. de. Fabaceae na Floresta Nacional (FLONA) de Assú, semiárido potiguar, nordeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 1, p. 105-123, 2016.
- AVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos do Cerrado: preservação gera muitos frutos. **Biociência**, Brasília, n. 15, jul-ago, 2000. Disponível em: <http://www.biociencia.com.br/revista/bio15/frutos.pdf>>. Acesso em 20 jan. 2014.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, v.4, n.1, p.145-153, 1998.
- BARBOSA, L. M.; MANTOVANI, W. Degradação ambiental: conceituação e bases para o repovoamento vegetal. In: BARBOSA, L. M. (Org.). Workshop sobre recuperação de áreas degradadas da serra do mar e formações florestais litorâneas, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, p. 34-40, 2000.
- BENTHAM, G. Leguminosae. In: BENTHAM, G.; HOOKER, J. D. *Genera Plantarum*. I.L. Reeve. London, v. 1, pt.2. 1865.
- BEZERRA, A. V.; SALOMÃO, R. P. Base de dados de espécies arbóreas ornamentais para o paisagismo urbano. Belém-PA: In: Seminário de iniciação científica PIBIC do museu paraense Emílio Goeldi. 23., 2013, Belém. **Anais...** Belém. 2013; 2005. p. 45.

BRAMMER, S. P. Variabilidade e diversidade genética vegetal: Requisito fundamental em um programa de melhoramento. Documentos *on line*: Embrapa Trigo. 2002.

CARVALHO, de F. C. B. **Avaliação dos Efeitos de *Cenostigma macrophyllum* na Neuropatia Diabética.** 83 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2009.

CATAPANO, A. L. Antioxidante effect of flavonoids. **Angiology**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1997.

CHAPPILL, J. A. Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis. In: M. D. CRISP; J. J. DOYLE (Eds.). Advances in legume systematics. **Royal Botanic Gardens, Kew**, 1995.

CLARKE, B. C.; MORAN, L. B.; APPELS, R. DNA analyses in wheat breeding. **Genome**, v. 32, p. 334-339, 1989.

COELHO, N. P. M. de F.; RANIERO, L.; COSTA, C. L. S.; MAIA FILHO, A. L. M.; MARTINS, M.; MARTIN, A. A.; ARISAWA, E. A. L. FT-Raman spectroscopic study of skin wound healing in diabetic rats treated with *Cenostigma macrophyllum* Tul. **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 30, n. 1, 47-53, Mar. 2014.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 105–115, 2003.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 349-356, 2001.

COSTA, C. L. S. **Constituintes Químicos e Atividade Antibacteriana, Antiulcerogênica e Hepatoprotetora da *Cenostigma macrophyllum* Tul var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae).** 137 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2005.

COWAN, R. S. Caesalpinioideae In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.) Advances in Legume Systematics. **Royal Botanical Gardens, Kew**. v 1, p.57-64, 1981.

CRONQUIST, A. **An integrated System of Classification of Flowering Plants.** Part II (Classe Magnoliopsida – Rosidae e Asteridae). New York: Columbia University Press, 1981.

CURTIS, J. D.; LERSTEN, N. R.; LEWIS, G. P. Leaf Anatomy, Emphasizing Unusual Concertina Mesophyll Cells, of Two East African Legumes (Caesalpinieae, Caesalpinioideae, Leguminosae). **Annals of Botany**, v. 78, p. 55-559, 1996.

DAHLGREN, R. General aspects of angiosperm evolution and macrosystematics. **Nordic Journal of Botany**. v. 3, 1983.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; BITTENCOURT, J. V. M.; CITADIN, I.; SACHAR, M. R. Proposta de protocolo para extração de DNA de jabuticabeira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 363-367, 2011.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, 1983.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: Wiley, 2003. 507 p.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 3, n. 3, p. 119-127, set. 1991.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987b.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, n. 3, p. 900–910, Mar. 2003.

DRÁBKOVÁ, L.; KIRSCHNER, J.; VLCEK, C. Comparison of seven DNA Extraction and Amplification Protocols in Historical Herbarium Specimens of Juncaceae. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 161-175, June, 2002.

DUCKE, A. Notas sobre a Flora Neotrópica– II. As leguminosas da Amazônia Brasileira. **Boletim Técnico do Instituto de Agronomia**. Belém, n. 18, 1949.

DUCKE, A. Plantes nouvelle ou peu connuesde la region amazonienne. *Cenostigma tocaninum* Ducke n. sp. **Archivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 29, pl. 10, 1915.

ELIAS, T. Mimosoideae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds), **Advances in Legume Systematics**, part 1. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 143-151. 1981.

ENGLER, A.; PRANTL, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien III, 3 (77) Leguminosae: II, 8. Caesalpinioideae: Sclerolobieae. 105. *Cenostigma*: 177. W. Engelmann, Leipzig. 1892.

ENNOS, R.A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, v. 72, p. 250–259, 1994.

FELSENSTEIN, J. **Theoretical Evolutionary Genetics**. Seattle, Washington. 393p. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220p.

FIASCHI, P.; PIRANI, J. R. Review of plant biogeographic studies in Brazil. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 47, p. 477–496, 2009.

- FIGLIOLIA, M. B.; OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Análise de sementes. In: **Sementes Florestais Tropicais**. Aguiar, I. B. de; Piña-Rodrigues, F. C. M. e Figliolia, M. B., coord. Brasília: ABRATES, 350p. 1993,
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. 617p, 2002.
- FREIRE, F. M. T. *Cenostigma tocantinum* Ducke (Leg. Caes.) — uma redescoberta da espécie. **Bradea**, v. 6, n. 36, p. 297 – 303, 1994a.
- FREIRE, F. M. T. **Revisão taxonômica do gênero *Cenostigma* Tul. (Leguminosae-Caesalpinioideae) para o Brasil**. 1994, 113f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)- Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1994b.
- FUJII, N.; TOMARU, N.; OKUYAMA, K.; KOIKE, T.; MIKAMI, T.; UEDA, K. Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) in Japan. **Plant Systematics and Evolution**, v. 232, p. 21–33. 2002.
- FUJII, N.; UEDA, K.; WATANO, Y.; SHIMIZU, T. Further analysis of intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Primula cuneifolia* Ledeb. (Primulaceae): implications for biogeography of the Japanese alpine flora. **Journal of Plant Research**, v. 112, p. 87–95. 1999.
- FUJII, N.; UEDA, K.; WATANO, Y.; SHIMIZU, T. Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* Steven (Scrophulariaceae) and geographic structuring of the Japanese “alpine” plants. **Journal of Plant Research**, v. 110, p. 195–207, 1997.
- GARCIA, L. C.; MORAES, R. P. D.; LIMA, R. M. B. D. Determinação do grau crítico de umidade em sementes de *Cenostigma tocantinum* Ducke. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.172-176, 2008.
- GORETTA, L. A.; CARRASQUEDO, F.; FRAGA, C. G. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. **Clinica Chimica Acta**. Great Britain, v. 349, n. 1-2, p. 97-103, 2004.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. de M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Ed. da UFRJ, 1996.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; WESSLER, S. R. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 10ª ed., 2013. p. 736.
- GUPTA, R.; CHANDRASHEKAR, U. S.; CHAKRABARTY, S. K.; DADLANI, M. A simple modified method of DNA extraction from seeds for PCR amplifications. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 82, n. 1, p. 75-77. 2012.
- HADOLIN, M.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. BAUMAN, D. High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*. **Food Chemistry**. Great Britain, v. 74, n. 3, p. 355-364, 2001.

- HAMILTON, M. B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 521–523, 1999.
- HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural forest population. In: SHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBIDE, B. & THOMAS, W. L. ed. **Genetic and Conservation**. New York, The Benjamin/Cummings Publication co, p. 335-348, 1983.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES, S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, Amsterdam. v. 6, n. 1-4, p. 95-124, mar, 1992.
- HAMRICK, J. L.; MURAWSKY, D. A. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology**, Utah, v. 5, n. 1, p 157-165, jun. 1990.
- HASTON, E. M.; LEWIS, G. P.; HAWKINS, J. A. A phylogenetic reappraisal of the *peltophorum* group (caesalpinieae: leguminosae) based on the chloroplast *trnL-f*, *rbcl* and *rps16* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 8, p. 1359–1371, 2005.
- HONJO, M.; UENO, S.; TSUMURA, T.; WASHITANI, I.; OHSAWA, R. Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. **Biological Conservation**, v. 120, p. 211–220, 2004.
- KAGEYAMA, P. Y. Conservação *In situ* de Recursos Genéticos de Plantas. **Revista do IPEF**. Piracicaba, v. 35, p. 7-37, 1987.
- KOTCHONI, S. O.; GACHOMO, E. W. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plantas. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1633-1636, 2009.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p. 707–713, 2005.
- LANES, E. C.; NICK, C.; KUKI, K. N.; FREITAS, R. D.; MOTOIKE, S. Y. Genomic DNA isolation of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) from leaf and stipe tissue samples for PCR analysis. **Genetic and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3905-3911, 2013.
- LAURANCE, S. G. W.; STOUFFER, P. C.; LAURANCE, W. F. Effects of road clearings on movement patterns of understory rainforest birds in central Amazonia. **Conservation Biology**, v.18, p. 1099-1109. 2004.
- LAURANCE, W. F.; LOVEJOY, T. E. Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-Year investigation. **Conservation Biology**, Montpellier, v. 13, n. 3, p. 605-618, jun. 2002.
- LAVIN, M.; SCHRIRE, B.; LEWIS, G.; PENNINGTON, R.T.; DELGADO-SALINAS, A.; THULIN, M.; HUGHES, C.; BEYRA MATOS, A. & WOJCIECHOWSKI, M.F. Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 359, p. 1509-1522, 2004.

LEMES, M. R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J., GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2875 – 2883, 2003.

LEMOS, A. H. **Controle e Prevenção de Doenças pela Medicina Natural e Ortomolecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 331p. 2006.

LERSTEN, N. R.; CURTIS, J. D. Survey of leaf anatomy, especially secretory structures, of Tribe Caesalpinieae (Leguminosae; Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, (in press). 1996.

LEWIS, G. P. *Caesalpinia*. A revision of the Poincianella-Erythrostemon Group. Royal Botanic Gardens, Kew. 1998.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LIMA, E. A; MELO, J. I. M. Biological spectrum and dispersal syndromes in an area of semi-arid region of north-eastern Brazil. *Acta Scientiarum*, **Biological Sciences**, v. 37, p. 91-100, 2015.

LIMA, H.C. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes**. Ortomolecular. São Paulo: Editora Atheneu, 331p. 2000.

LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; SOUZA, V. C.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; FORTUNATO, R. H.; VAZ, A. M. S. F.; SOUZA, E. R.; FILARDI, F. L. R.; VALLS, J. F. M.; GARCIA, F.C. P.; FERNANDES, J. M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREZ, A. P. F.; MANSANO, V. F.; MIOTTO, S. T. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MEIRELES, J. E.; LIMA, L. C. P.; OLIVEIRA, M. L. A. A.; FLORES, A. S.; TORKE, B. M.; PINTO, R. B.; LEWIS, G. P.; BARROS, M. J. F.; RIBEIRO, R. D.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B. B.; RANDO, J. G.; SCALON, V. R.; CARDOSO, D. B. O. S.; COSTA, L. C.; SILVA, M. J.; MOURA, T. M.; BARROS, L. A. V.; SILVA, M. C. R.; QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B; CAMARGO, R. **Fabaceae In: Lista de espécies da flora do Brasil**. Vol. 2. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 989-1102. 2013.

LINS, P. M. P.; FARIAS NETO, J. T.; MULLER, A. A. Avaliação de híbridos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) para produção de frutos e de albumen sólido fresco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 468-470, 2003.

LORENZ-LEMKE, A. P., MUSCHNER, V. C., BONATTO, S. L., CERVI, A. C., SALZANO, F. M., FREITAS, L. B. Phylogeographic Inferences Concerning Evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) Based on ITS (nrDNA) Variation. **Annals of Botany**, v. 95, n. 5, p. 799-806, 2005.

- LORENZI, H. Leguminosae-Caesalpinioideae, **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v. 2, p. 143 – 144. Editora Plantarum, Nova Odessa. 1998.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.R. Ecological determinants of genetic structure in plant mutation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.
- MARTINS, E. R.; DE CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa, Minas Gerais: Ed: da UFV, 1998.
- MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: MMA/SBF, Brasília – DF. 532 p. 2011.
- MEDINA, J. C. **Plantas Fibrosas da Flora Mundial**. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 913 p. 1959.
- MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, A. V.; NOGUEIRA, P. E. Flora Vascular do Bioma Cerrado. In **Cerrado: Ambiente e Flora**, 1998.
- MILLER, A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **PNAS**, v.102, p. 12801-12806, 2005.
- MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 353-358, 2011.
- MURAKAMI, A.; TANAKA, S.; OHIGASHI, H.; HIROTA, M.; IRIE, R.; TAKEDA, N.; TATEMATSU, A.; KOSHIMIZU, K. Possible anti-tumor promoters: bi- and tetraflavonoids from *Lophira alata*. **Phytochemistry**, Great Britain, v. 31, n. 8, p. 2689-2693, 1992.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, p. 140–145, 1999.
- NOVAES, R. M.; LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 985–998, 2010.

NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2885-2893, 2003.

OLSZEWER, E. **Como vencer a batalha contra o Envelhecimento**. São Paulo: Ícone Editora, 159p. 2005.

PAMIDIMARRI, D. V. S.; MEENAKSHI; SARKAR, R.; BORICHA, G.; REDDY, M. P. A simplified method for extraction of high quality genomic DNA from *Jatropha curcas* for genetic diversity and molecular marker studies. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 187-192. April 2009.

PELTIER, J. B., FRISO, G., KALUME, D. E., ROEPSTORFF, P., NILSSON, F., ADAMSKA, I., EVAN WIJK, K. J. Proteomics of the chloroplast: Systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. **The Plant Cell**, v. 12, p. 319-342, 2000.

PENNINGTON, R. T.; RATTER, J. A.; LEWIS, G. P. **Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation**. Boca RatonFL: CRC/Taylor & Francis. 484 p. 2006.

PFANNSCHMIDT, T.; SCHUTZE, K.; FEY, V.; SHERAMETI, I.; OELMULLER, R. Chloroplast redox control of nuclear gene expression - a new class of plastid signals in interorganelar communication. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 1 p. 95-101, 2003.

PIAULINO, C. A. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Antidiabética das Cascas de Cenostigma macrophyllum Tul var. acuminata Teles Freire**. 2011, 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia de Produtos Naturais) Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011.

PIAULINO, C. A.; CARVALHO, F. C. B.; ALMEIDA, B. C.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C; BRITO, S. M. R. C. The stem bark extracts of *Cenostigma macrophyllum* attenuates tactile allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**. 2013. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2013.786096>.

PIERCE, B. A. **Genética um enfoque conceitual**. 3º ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 802 p. 2011.

POLHILL, R. M. Papilionoideae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed). **Advance in legume systematics**. Part 1. Phylogeny. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 191-208. 1981.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana/Royal Botanic Gardens, Kew, Associação Plantas do Nordeste, 2009.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M. A.; SOUZA, J. C. **Genética na Agropecuária**. 5 ed., rev. Lavras: Ed. UFLA, 566 p. 2012.

- RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. C.; SANTOS, F. R.; LOVATO, M. B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1219-1228, 2007.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIGGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230. 1997.
- RIBEIRO, R. C.; PELACANI, C. R. Influência do manitol e NaCl na germinação de sementes de duas espécies de leguminosas com importância no semi-árido baiano. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 2, p. 105-109, 2006.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Wageningen, v. 1, p. 499-514, 1973.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: Soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, Brasília, n. 9, p. 40-43, 1999.
- SAHA, S.; CALLAHAN, F. E.; CREECH, J. B. Cotton improvement effect of lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA and protein. **The Journal of Cotton Science**, v.1, p. 10-14, 1997.
- SANTOS, F. J. B. **Constituintes químicos da fase hidroalcoólica e atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico de folhas da *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae)**. 148 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2001.
- SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 439 p. 2005.
- SCHAAL, B. A.; HAYWORTH, D. A.; OLSEN, K. M.; RAUSCHER, J. T.; SMITH, W. A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 465-474, 1998.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 6 Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1104p, 2007.
- SILVA, E. F. L.; MIRANDA, J. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E. M. S.; NUNES, L. A. P. L. Natural nodulation of legume in the savana soils from Piauí state. **Agrária**. v. 4, n. 3, p. 274-277, 2009.
- SILVA, H. R.; SILVA, C. C. M.; CALAND NETO, L. B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes Químicos das Cascas do Caule de *Cenostigma macrophyllum*: Ocorrência de Colesterol. **Química Nova**. v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SILVA, L. M.; CHAVES, M. H.; ROQUE, N. F. Isoprenóides das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (Caesalpinieae). In: **22 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, Poços de Caldas – MG. 1999.

SILVA, M. M. F. *Macrobium* Schreb., *Peltogyne* Vog. e *Eperua* Aubl. Leguminosae: Caesalpinioideae: Detarieae da Floresta Nacional de Caxiuanã, com ênfase na grade do PPBIO, Pará, Brasil. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2008.

SILVA, M. N. Extration of Genomic DNA from Leaf Tissues of Mature Native Species of the Cerrado. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 34, n. 6, p.973-978, 2010.

SIMPSON, B. B.; TATE, A. J.; WEEKS, A. Phylogeny and Character Evolution of *Hoffmannseggia* (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). **Systematic Botany**, v. 29, n. 4, p. 933-946, 2004.

SOUSA, C. C.; GOMES, S. O.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; BRITTO, F. B.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparison of methods to isolate DNA from *Caesalpinia férrea*. **Genetics and Molecular Research**. v. 13, n. 2, p. 4486-4493, 2014.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G.M.; AYRESM.C.C.; COSTA, C.L.S.d.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.d.M.; BRANDÃO, M.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Fanerógamas Nativas e Exóticas no Brasil**, baseado em APG III. 3.ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2012.

SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 146p. 2001.

SUGITA, M.; E SUGIURA, M. Regulation of gene expression in chloroplasts of plastid higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 315-326, 1996.

TAYLOR, J. W.; SWANN, E. C. Dried samples: soft tissues, DNA from herbarium specimens. In: Herrmann, B and Hummel, S. (eds), *Ancient DNA*-Springer Verlag, 1994.

TULASNE, L. R. Nova Leguminosarum genera, *Cenostigma*. **Annales des Sciences Naturelles Botanique**, v. 2, n. 20, p. 140 –141. 1843.

VALLE, A. E. Leguminosaceae. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. de. Plantas da Caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímica e Atividade Biológica. **Associação plantas do Nordeste**, Recife, v. 4. 2006.

VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1939-1946, 2004.

VIANA, A. F. S. C.; FERNANDES, H. B.; SILVA, F. V.; OLIVEIRA, I. S.; FREITAS, F. F. B. P.; MACHADO, F. D. F.; COSTA, C. L. S.; ARCANJO, D. D. R.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 150, p. 316-323, 2013.

WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. A revision of *Cenostigma* (Leguminosae – Caesalpinioideae – Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil. **Kew Bulletin**, v. 64, p. 135–146, 2009.

WERNECK, F. P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews** v. 30, p. 1630–1648, 2011.

CAPÍTULO I

Comparação entre quatro métodos de extração de DNA de *Cenostigma macrophyllum*¹

¹Artigo: “*Comparison of four DNA extraction methods for Cenostigma macrophyllum*”

RESUMO

Cenostigma macrophyllum Tul. é uma espécie nativa e endêmica do nordeste do Brasil, presente nos biomas de Cerrado e Caatinga, pertencente à família Fabaceae: Caesalpinioideae. É conhecida popularmente por caneleiro, canela-de-velho, canela-de-veado, maraximbé ou fava do campo. Apesar da sua importância farmacológica, pouco ainda se sabe sobre a diversidade genética dessa espécie. Informações sobre a variabilidade genética são importantes para o estabelecimento de estratégias que visem à sua conservação. Por sua vez, a obtenção de DNA de boa qualidade é um passo fundamental para estudos moleculares de plantas. O estudo da genética populacional de uma espécie envolve muitas vezes a amplificação de regiões genômicas via reação em cadeia da polimerase (PCR). O sucesso da PCR tem relação direta com a preparação do ácido nucleico que contém a sequência de DNA alvo para a amplificação. Desta forma, a aplicação de um determinado protocolo de extração poderá influenciar no isolamento de quantidades suficientes de DNA, de qualidade no mínimo satisfatórias, para a execução das etapas de análise subsequentes dos projetos de pesquisa que envolvam, por exemplo, a PCR e as atividades de digestão do material genético com as enzimas de restrição. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de quatro protocolos de extração de DNA de *C. macrophyllum* para folhas jovens, folhas maduras e sementes, por meio da quantificação pelo NanoDrop e pelo QuBit 2.0 (Invitrogen), e da amplificação via PCR de regiões do genoma cloroplastidial. Os protocolos *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), Ferreira e Grattapaglia (1998), Katchoni e Gachomo (2009) e HotSHOT foram analisados quanto a sua eficiência, vantagens e desvantagens. O DNA proveniente do kit comercial *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) foi analisado ainda quanto a ação de endonucleases de restrição. O kit comercial se mostrou eficiente em todas as fontes de DNA, folhas jovens, folhas maduras e sementes. O protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998), mostrou baixa repetibilidade dos resultados. Já os protocolos de Katchoni e Gachomo (2009) e HotSHOT foram eficientes na extração de DNA de sementes, se destacando como protocolos inovadores, rápidos, de fácil execução, e livres de reagentes tóxicos.

Palavras - chave: Caneleiro, DNA de sementes, variabilidade genética.

ABSTRACT

Cenostigma macrophyllum Tul. is a native and endemic species from northeastern Brazil, present in the Cerrado and Caatinga biomes, belonging to the Fabaceae family: Caesalpinioideae. It is popularly known by caneleiro, cinnamon-de-viejo, cinnamon-deer, maraximbé or fava from the field. Despite its pharmacological importance, little is known about the genetic diversity of this species. Information on genetic variability is important for the establishment of strategies for its conservation. In turn, obtaining good quality DNA is a key step in molecular plant studies. The study of the population genetics of a species often involves the amplification of genomic regions via polymerase chain reaction (PCR). The success of PCR is directly related to the preparation of the nucleic acid containing the target DNA sequence for the amplification. Thus, the application of a specific extraction protocol may influence the isolation of sufficient DNA of at least satisfactory quality for the execution of the subsequent analysis steps of the research projects involving, for example, PCR and activities of digestion of the genetic material with the restriction enzymes. The objective of this work was to compare the efficiency of four DNA extraction protocols of *C. macrophyllum* for young leaves, mature leaves and seeds, by quantification by NanoDrop and QuBit 2.0 (Invitrogen), and PCR amplification of regions of chloroplast genome. The protocols DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), Ferreira and Grattapaglia (1998), Katchoni and Gachomo (2009) and HotSHOT were analyzed for their efficiency, advantages and disadvantages. DNA from the commercial kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) was further analyzed for the action of restriction endonucleases. The commercial kit proved to be efficient in all sources of DNA, young leaves, mature leaves and seeds. The protocol of Ferreira and Grattapaglia (1998), showed low repeatability of the results. The protocols of Katchoni and Gachomo (2009) and HotSHOT have been efficient in extracting DNA from seeds, standing out as innovative protocols, fast, easy to perform, and free of toxic reagents.

Key words: Caneleiro, seed DNA, genetic variability.

INTRODUÇÃO

Cenostigma macrophyllum Tul. é uma espécie nativa e endêmica do nordeste do Brasil, presente nos biomas de Cerrado e Caatinga. Pertencente à família Fabaceae: Caesalpinioideae, é conhecida popularmente por caneleiro, canela-de-velho, canela-de-veado, maraximbé ou fava do campo. A medicina popular atribui às cascas do caule, folhas e flores dessa espécie propriedades de cura de afecções estomacais e intestinais. Dentre as propriedades comprovadas em estudos científicos constam antiinflamatórias, analgésicas, antimicrobiana e antiulcerogênica (SILVA et al., 2007; SOUSA et al., 2007). Estudos mostraram que os extratos e frações das folhas e do caule de *C. macrophyllum* apresentam alto teor de fenólicos totais, o que explica a ação antioxidante, antiulcerogênica, o efeito analgésico e antibacteriano desta planta (ALVES et al., 2012; VIANA et al., 2013; PIAULINO et al., 2013).

Apesar da sua importância na farmacologia, não há relatos na literatura de estudos moleculares com *C. macrophyllum*. Conhecer a variabilidade genética existente nas populações naturais é de fundamental importância para elucidar a biologia da espécie (BRAMMER, 2002). As informações sobre o sistema de reprodução, diversidade e estrutura genética são indispensáveis para o estabelecimento de estratégias que visem à conservação da variabilidade genética existente, o que contribui consideravelmente para a manutenção do potencial evolutivo da espécie.

O passo fundamental para se obter sucesso nos estudos moleculares de plantas, consiste no isolamento e purificação de quantidade suficiente de DNA de alta qualidade para a execução de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e atividade de digestão com endonucleases de restrição. A extração de DNA em plantas além de laboriosa, é dificultada pela presença dos compostos secundários do metabolismo de suas células. Estes compostos são liberados com a lise celular e inibem a ação de enzimas como a *Taq* polimerase e enzimas de restrição. O método de extração de DNA deve, no entanto, ser capaz de isolar o DNA desses compostos a fim de possibilitar a ação das enzimas. Nos protocolos tradicionais, reagentes como clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e β -mercaptoetanol têm esta função, eles atuam como antioxidantes e se ligam a esses compostos precipitando-os, deixando assim o DNA livre, porém apresentam a desvantagem de serem tóxicos.

Além de obrigar o manuseio de reagentes tóxicos, os protocolos tradicionais de extração de DNA demandam tempo e geram grande volume de resíduos. Já os kits comerciais

são mais práticos, livres de reagentes tóxicos, entretanto, oneram os projetos de pesquisa. Isso se torna um inconveniente quando um grande número de amostras precisam ser processadas, o que é comum em estudos de genética populacional.

Diante do exposto, o objetivo do nosso estudo foi comparar a eficiência de quatro protocolos de extração de DNA na espécie *C. macrophyllum*, para folhas jovens, folhas maduras e sementes, por meio da amplificação via PCR, de regiões do genoma cloroplastidial (*cpDNA*). Os protocolos *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), Ferreira e Grattapaglia (1998), Katchoni e Gachomo (2009) e HotSHOT (TRUETT et al., 2000) foram analisados quanto a sua eficiência, vantagens e desvantagens. O DNA proveniente do *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) extraído de folhas jovens, do endosperma da semente e do caule, foi analisado quanto à ação de endonucleases de restrição.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte em Teresina/PI. As amostras de folhas jovens, folhas maduras e sementes de *C. macrophyllum* foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Piauí – UFPI/CCA, acondicionadas em isopor com gelo e colocadas no freezer a – 20°C até o momento da extração de DNA. Para a extração foram utilizados 100 mg do tecido fresco, com exceção do protocolo HotSHOT, no qual 25 mg do tecido foram utilizados. Para as sementes, o tecido utilizado foi o endosperma.

Os quatro protocolos foram estabelecidos conforme as descrições a seguir:

1) *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen)

Soluções:

- Buffers *DNeasy Plant Mini Kit* (AP1, AP2, AP3, AE)
- EtOH 100%

Equipamentos:

- Balança de precisão
- Precellys e tubos para Precellys
- Centrífuga
- Banho-maria (65°C)
- Tubos para microcentrífuga 1,5 µL

Protocolo:

O tecido foi pesado, cortado em pedaços pequenos e colocado em tubos de Precellys com cinco esferas de vidro de 3 mm. Foi adicionada a solução de lise (AP1) e levado ao Precellys a 5700 rpm em temperatura ambiente por dois ciclos de oito segundos com intervalo de dez segundos entre cada ciclo. Em seguida, as amostras seguiram para o banho-maria a 65°C, no qual permaneceram por 30 minutos. Posteriormente, foi dada continuidade no processo de extração seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do kit comercial.

2) *Ferreira e Grattapaglia (1998)***Soluções:**

- Solução de lise
- clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)
- Isopropanol
- Etanol 70% e 95%
- TE

Equipamentos:

- Balança de precisão
- Precellys e tubos para precellys
- Centrífuga
- Banho-maria (65°C)
- Tubos para microcentrifuga 1,5µL

Protocolo:

Para cada amostra, usou-se 700µL do tampão de extração (Para 50 mL de tampão: 1 g CTAB; 0,5 g PVP; 14 mL NaCl 5M; 2,0 mL EDTA 500 mM; 5,0 mL Tris-HCl 1 M; 100 mL 2-mercaptoetanol). Os tecidos vegetais foram pesados, cortados em pedaços pequenos e colocados em tubos para Precellys, com cinco esferas de vidro de 3 mm, levados ao Precellys a 5500 rpm, em temperatura ambiente, por dois ciclo de 16 segundos, com intervalo de dez segundos entre os ciclos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C, por 30 minutos nas quais adicionou-se 160µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); centrifugou-se as amostras por 10 minutos e pipetou-se a fase superior para novos tubos. À essa fase aquosa, foi adicionado 1/10 do volume com uma solução de 10% de CTAB e 1,4M NaCl. Repetiu-se a operação de 160 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Adicionou-se 2/3 do volume da solução de isopropanol gelado e armazenou-se a -20 °C por 30 minutos. Centrifugou-se

durante três minutos lavando o pellet duas vezes em de etanol 70% e uma vez em etanol 95%. Retirou-se o etanol e em seguida deixou-se a amostra secar durante duas horas. Ressuspendeu-se o pellet em 50 µL de TE e 2 µL de RNase. As amostras foram acondicionadas a -20°C.

3) *Katchoni e Gachomo (2009)*

Soluções:

- Buffer de extração (1% SDS, 0,5 M NaCl)
- Isopropanol
- Etanol 70%

Equipamentos:

- Balança de precisão
- Precellys e tubos para precellys
- Centrífuga
- Banho-maria (65°)
- Tubos para microcentrífuga 1,5µL

Protocolo:

Este protocolo seguiu com algumas modificações, em relação ao protocolo original (Kotchoni e Gachomo, 2009), especialmente no que se refere à etapa de maceração do tecido vegetal. As amostras foram pesadas (100 mg), colocadas em tubos específicos para o Precellys, com 400 µL do tampão de lise e levadas ao Precellys a 5.800 rpm em temperatura ambiente, por dois ciclos de oito segundos, com intervalo de dez segundos entre os ciclos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por um minuto, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 400 µL de isopropanol foi adicionado e misturado vagarosamente por inversão. A centrifugação foi repetida e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 13.000 rpm por um minuto a temperatura ambiente e o etanol foi descartado. Secou-se o excesso do etanol com papel toalha, as amostras permaneceram em secagem ao ar por alguns minutos. O DNA foi diluído em 50 µL de ddH₂O e estocado à -20°C.

4) *HotSHOT*

Soluções:

- Lise alcalina: 25mM NaOH e 0,2 mM EdTA
- Reagente de Neutralização: 40mM Tris-HCl

Equipamentos:

- balança de precisão
- termociclador
- micropipetas
- tubos de PCR

Protocolo:

As amostras foram pesadas (25mg), colocadas em tubos de PCR com 75 μ L do tampão de lise alcalina e levadas ao termociclador a 95° C, por 30 minutos. Em seguida, fez-se a maceração manualmente com auxílio de uma agulha de croché e as amostras foram colocadas a 4°C por 10 minutos. Adicionou-se 75 μ L da solução de neutralização e 2 μ L da preparação final foi utilizada para PCR de volume de 20 μ L.

Quantificação e Reações de amplificação

A quantificação de ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria, no NanoDrop ND-1000 a 260 nm (SAMBROOK; FRITSCH; MAMIATIS, 1989) e a sua pureza foi avaliada pela relação da absorbância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e 260 e 230 nm (A_{260}/A_{230}). A absorbância a 260 nm reflete a concentração dos ácidos nucleicos e a razão entre 260 e 280 revela a presença de proteínas na amostra. A quantificação específica do DNA foi feita também por fluorimetria, utilizando o aparelho QuBit 2.0 (Invitrogen).

As reações de amplificação via PCR foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), programado com etapa inicial de desnaturação de 1 minuto a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto para o anelamento dos *primers* de cpDNA com temperatura específica de cada iniciador, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C (Tabela 1).

Essas reações foram preparadas em volume final de 20 μ L, contendo aproximadamente 15 ng de DNA, 0,25 mM de dNTP, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,2 μ M de *primer*, 3,0 mM de MgCl₂, 2,0 μ L de tampão 1 \times e H₂O ultrapura.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5 \times conduzido a 80 V, por 120 minutos e corado com GelRed-Biotium 10.000 \times (Uniscience). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com o marcador DNA *Ladder* 1 Kb e 100bp (Invitrogen), sendo visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação do cpDNA.

Iniciador/Primer	Sequência (5' – 3')	Combinação Usada	pb*	TA °C
trnH(GUG)	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	trnH(GUG) – psbA	~450	53
psbA	CGAAGCTCCATCTACAAATGG			
trnL(UAA)intronF	CGAAATCGGTAGACGCTACG	trnL(UAA)intronF - trnL(UAA)intronR	~500	60
trnL(UAA)intronR	GGGGATAGAGGGACTTGAAC			55
rbcL1	ATGTCACCACAAACAGARACTAAAGC	rbcL1- rbcL3ambigR	~500	
rbcL3ambigR	GGCGGACCTTGAAAGTTTTTARTATAAG			
rbcL2	CTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	rbcL2 - rbcL4F	~500	55
rbcL4F	GCAGTTATCGATAGACAGAAGAATCATG GT			
rbcL3ambigF	KCTTATAYTAAAACCTTCCAAGGTCCGCC	rbcL3ambigF- rbcL4R	~800	55
rbcL4R	ACCATGATTTTTCTGTCTATCAAATAACT GC			

*pb: tamanho do fragmento amplificado em pares de bases. TA: temperatura de anelamento.

Digestão com enzimas de restrição

O DNA genômico extraído com o *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), a partir de sementes, folhas e caule foi submetido à digestão com as endonucleases de restrição *HincII*, *HaeII*, *RsaI*, *DraI*, *EcoRI* e *BstUI* (New England BioLabs). As reações foram preparadas para volume final de 20 µL, contendo 16,3 µL de água deionizada, 2 µL de Buffer (Buffer 10x: 900mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl e 100 mM MgCl₂ a 37°C), 0,2 µL de BSA a 10 µg/µL e 0,5 µL da respectiva enzima de restrição contendo 10 U/µL. As reações para digestão foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), com a seguinte programação: 15 horas a 37°C para a atuação da enzima de restrição, seguido de 20 minutos a 65°C para a sua inativação. A análise do DNA digerido se deu com a corrida em gel de agarose 1,5% e corado com GelRed-Biotium 10.000 × (Uniscience).

RESULTADOS

A quantificação pelo NanoDrop indicou a presença de ácidos nucleicos nas amostras dos quatro métodos de extração de DNA utilizados, em altas concentrações, principalmente

para as amostras de sementes. Entretanto, as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} que determinam a pureza do material genético foi satisfatória, de modo geral, apenas para as amostras extraídas com *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), onde a razão A_{260}/A_{280} permaneceu, em média, entre 1,8 e 2,0 o que determina ácidos nucleicos livres da presença de proteínas. A razão A_{260}/A_{230} também se mostrou satisfatória apenas para as amostras do kit comercial, permanecendo próximo de 1,8 a 2,2 o que indica ácidos nucleicos livres de impurezas, como fenóis e outros contaminantes (Tabela 1).

A quantificação realizada pelo QuBit 2.0, especificamente para DNA, mostrou concentrações mais baixas que a quantificação pelo NanoDrop, no entanto, satisfatórias para as amostras extraídas com o *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) de folhas jovens, folhas maduras e sementes. Para os outros três protocolos, Ferreira e Grattapaglia (1998), Kotchoni e Gathomo (2009) e HotSHOT (TRUETT et al., 2000) a quantificação evidenciou concentrações satisfatórias apenas para as amostras de sementes (Tabela 2).

Tabela 1 - Quantificação e purificação pelo NanoDrop das amostras de *C. macrophyllum*.

Protocolos	Material	Concentração ng/ μ L	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
<i>DNeasy Plant</i>	FJ	154,2	2,07	2,28
<i>Mini Kit –</i>	FM	164,0	1,73	1,98
<i>Qiagen</i>	SEM	268,4	1,98	1,75
Ferreira e	FJ	21,3	0,64	0,28
Grattapaglia,	FM	39,6	0,85	0,44
1998	SEM	317,1	2,03	2,39
Kotchoni e	FJ	20,8	0,96	0,58
Gachomo,	FM	9,4	0,74	0,24
2009	SEM	814,2	1,64	0,49
HotSHOT	FJ	1.186	0,86	0,52
(TRUETT, et	FM	1.617	0,89	0,61
al. 2000)	SEM	4.237	1,16	0,98

FJ: folha jovem; FM: folha madura; SEM: semente

Tabela 2 - Quantificação do DNA pelo QuBit 2.0 em ng/ μ L.

Fonte de DNA	<i>DNeasy Plant</i>	Ferreira e	Kotchoni e	HotSHOT
	<i>Mini Kit</i>	Grattapaglia, 1998	Gatomo, 2009	
Folha Jovem	23,0	3,2	< 2,0	< 2,0
Folha Madura	21,4	< 2,0	< 2,0	< 2,0
Semente	94,3	30,7	82,7	32,0

O *DNeasy Plant Mini Kit* se mostrou eficiente na extração de DNA dos três tipos de tecidos vegetais analisados, folhas jovens, folhas maduras e sementes. A amplificação na PCR ocorreu com os cinco pares de iniciadores de *cpDNA* testados, para todas as amostras, evidenciando que, além das folhas jovens, as folhas maduras e as sementes também são fontes viáveis de DNA de boa qualidade para estudos moleculares em *C. macrophyllum* (Figura 1).

O protocolo sugerido por Ferreira e Grattapaglia (1998) de um modo geral, se mostrou pouco eficiente, uma vez que não houve um padrão nos resultados observados através das amplificações via PCR. Para os cinco pares de iniciadores testados, a amplificação ocorreu aleatoriamente nas amostras de folhas jovens, folhas maduras e sementes (Figura 2).

Para os protocolos Kotchoni e Gachomo (2009) (Figura 3) e HotSHOT (Figura 4), a extração de DNA se mostrou eficiente apenas para as sementes. Não houve amplificação para nenhum dos iniciadores com as amostras de folhas jovens e folhas maduras, o que indica a ausência de DNA de boa qualidade, que possibilitaria a amplificação para estas amostras. Já para as sementes, houve amplificação para todos os cinco pares de iniciadores nas amostras obtidas por esses métodos.

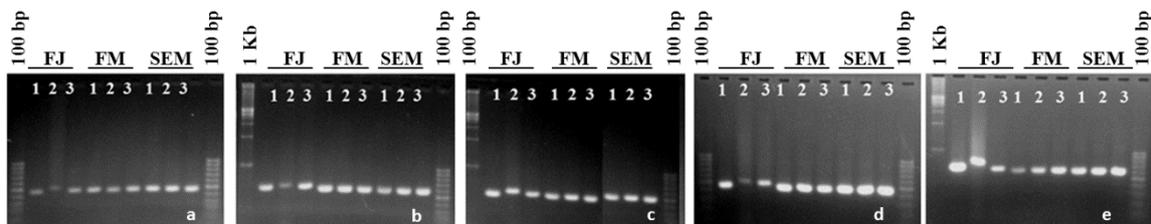


Figura 1. PCR com DNA molde proveniente do *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) a) *trnH*(GUG)-*psbA*, b) *rbcL* 4F- *rbcL* 2R, c) *rbcL* 3F-*rbcL* 4R, d) *rbcL* 1F-*rbcL* 3R, e) *trnH*(UAA)F- *trnH*(UAA)R.

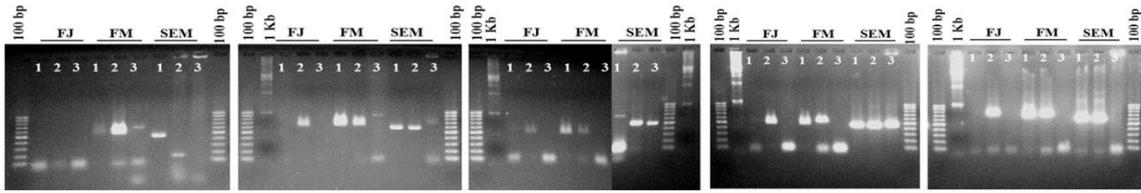


Figura 2. PCR com DNA molde proveniente do protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998). a) *trnH(GUG)*-*psbA*, b) *rbcL* 4F- *rbcL* 2R, c) *rbcL* 3F-*rbcL* 4R, d) *rbcL* 1F-*rbcL* 3R, e) *trnH(UAA)*F- *trnH(UAA)*R.

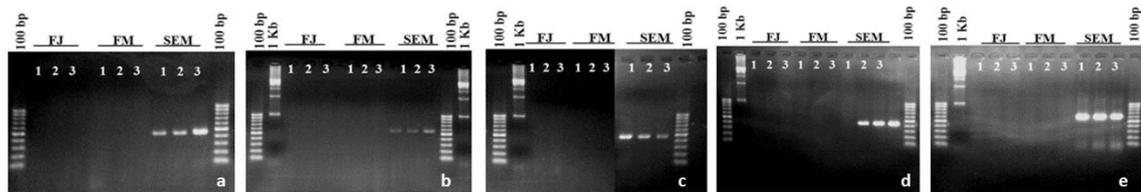


Figura 3. PCR com DNA molde proveniente do protocolo de Kotchoni e Gachomo (2009). a) *trnH(GUG)*-*psbA*, b) *rbcL* 4F- *rbcL* 2R, c) *rbcL* 3F-*rbcL* 4R, d) *rbcL* 1F-*rbcL* 3R, e) *trnH(UAA)*F- *trnH(UAA)*R.

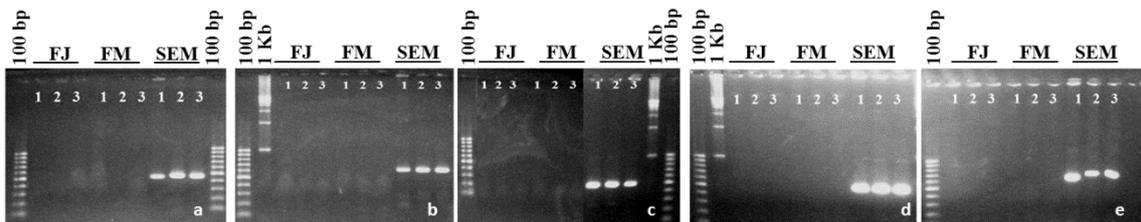


Figura 4. PCR com DNA molde proveniente do protocolo HotSHOT (TRUETT et al., 2000). a) *trnH(GUG)*-*psbA*, b) *rbcL* 4F- *rbcL* 2R, c) *rbcL* 3F-*rbcL* 4R, d) *rbcL* 1F-*rbcL* 3R, e) *trnH(UAA)*F- *trnH(UAA)*R.

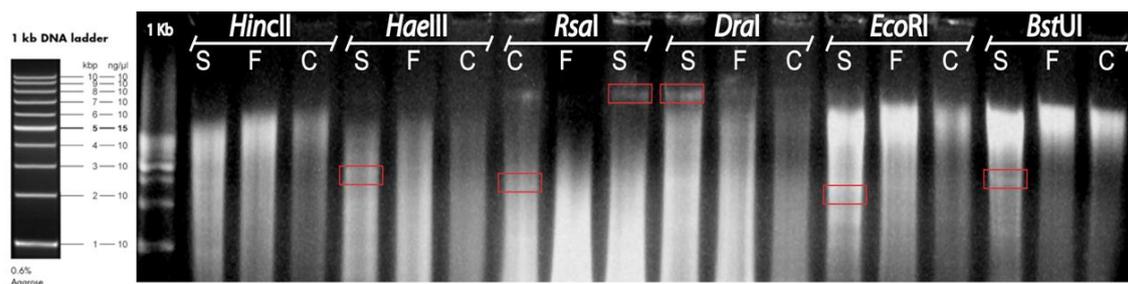


Figura 5. Teste de digestão do DNA de *C. macrophyllum* com enzimas de restrição. S: semente, F: folha, C: caule.

DISCUSSÃO

A extração de DNA é a etapa fundamental para o êxito em estudos moleculares, como a utilização de marcadores moleculares, uma importante ferramenta para a caracterização da diversidade genética em plantas, visto que fornece a base para se traçar estratégias de conservação das espécies. No entanto, para as plantas, esta etapa requer testes preliminares a fim de se certificar de que o protocolo de extração de DNA que se deseja utilizar é mesmo eficiente para a espécie em estudo. Existe na literatura grande diversidade de métodos para se extrair DNA de plantas, visto que a presença de compostos secundários do metabolismo vegetal, que varia de uma espécie para outra, tende a prejudicar as análises subsequentes. Neste caso, o protocolo adotado deve ser capaz de isolar estes compostos da molécula de DNA, a fim de que se possa obter sucesso na amplificação via PCR e na digestão com endonucleases de restrição.

A metodologia mais indicada seria a utilização dos kits comerciais para a extração de DNA, pois apresentam muitas vantagens, incluindo a praticidade, a simplicidade, a repetibilidade dos resultados e o fato de dispensar o manuseio de reagentes tóxicos. A desvantagem, muitas vezes o fator decisivo na escolha do protocolo, é o alto custo dos kits, o que onera significativamente os projetos de pesquisa. Nesse trabalho, o uso do kit comercial *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) mostrou resultados bem satisfatórios. Na quantificação pelo NanoDrop, que revela as concentrações dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), os resultados foram bons, com destaque para as amostras das sementes que mostraram concentrações notavelmente mais elevadas. As razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} que determinam a pureza do material genético foram satisfatórias permanecendo próximas aos padrões determinados de 1,80 – 2,00 para A_{260}/A_{280} e 1,80 - 2,20 para A_{260}/A_{230} (Tabela 1).

A quantificação pelo QuBit, realizada especificamente para o DNA, revelou valores de concentrações menores que as quantificadas pelo NanoDrop, do que se deduz que no produto final da extração pelo *DNeasy Plant Mini Kit* há a presença tanto de DNA como de RNA (Tabela 2). A concentração de DNA nas sementes permaneceu notoriamente maior, o que revela o endosperma das sementes de *C. macrophyllum* como uma excelente fonte de material genético para estudos de Biologia Molecular.

Confirmando os resultados das quantificações do DNA obtidos pelo *DNeasy Plant Mini Kit*, as amplificações na PCR transcorreram com sucesso para os cinco pares de iniciadores de *cpDNA* em *C. macrophyllum*, para todas as amostras de folhas jovens, folhas maduras e sementes, mostrando que este método é eficiente para a obtenção de DNA de alto peso molecular, necessários para estudos subsequentes.

O protocolo publicado por Ferreira e Grattapaglia (1998), que consiste em uma variação do método de Doyle e Doyle (1987), se mostra eficiente para muitas espécies de plantas. Este método apresenta desvantagens como o fato de ser laborioso, demorado, gerar grande quantidade de resíduos e obrigar o manuseio de substâncias neurotóxicas, como o β -mercaptoetanol, o fenol:clorofórmio que, no processo de extração de DNA, atuam como antioxidantes, contribuindo para a purificação do DNA, sendo este ponto considerado a principal desvantagem do método.

No presente estudo, os resultados obtidos com este protocolo não foram satisfatórios para *C. macrophyllum*. A quantificação dos ácidos nucleicos pelo NanoDrop mostrou baixa concentração, porém suficiente, para as folhas jovens e folhas maduras (Tabela 1), com exceção das sementes, que resultaram em altas concentrações de ácidos nucleicos, 317,1 ng/ μ L, sendo este valor a média das amostras. As razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram muito abaixo do esperado para as folhas jovens e folhas maduras, evidenciando que o método não foi eficaz no isolamento do DNA, visto que existe presença de contaminantes como proteínas e compostos do metabolismo secundário nas amostras. Para as sementes, as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} permaneceram próximo ao esperado. A quantificação pelo QuBit resultou em concentração de DNA satisfatória apenas para as sementes. A amplificação dos cinco pares de iniciadores de DNACp para *C. macrophyllum* neste protocolo foi de baixa repetibilidade, comprovando a baixa eficiência desse método (Figura 2).

Os resultados de Sousa et al. (2014), para a extração de DNA a partir de folhas de *Caesalpinia férrea*, mostraram altas concentrações de DNA, na extração pela quantificação em gel de agarose a 0,8%, porém após a PCR, utilizando iniciadores de RAPD, não houve amplificação, provavelmente por conta de substâncias interferentes decorrentes do metabolismo secundário dessa espécie, o que evidencia a falha do método na etapa de purificação do DNA.

O protocolo de Kotchoni e Gachomo (2009) surgiu da necessidade de um método rápido e simples, que possibilitasse a extração de DNA de centenas de amostras, em um dia de trabalho. Dispensando o uso do nitrogênio líquido, a utilização de reagentes tóxicos e encurtando as etapas de lavagem do DNA, este método reduziu drasticamente o tempo e o custo da extração de DNA. Foi aplicado com sucesso para *Arabidopsis thaliana* e os autores afirmam que é possível obter bons resultados para várias espécies de plantas. Para *C. macrophyllum*, fez-se algumas alterações no protocolo, como a utilização do homogeneizador Precellys e do banho-maria a 65°C.

A quantificação pelo NanoDrop mostrou baixa concentração de ácidos nucleicos para folhas jovens e folhas maduras e alta concentração para as sementes. As razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram muito abaixo do esperado para as folhas jovens, folhas maduras e sementes (Tabela 1). A quantificação pelo QuBit resultou em alta concentração de DNA apenas para as sementes (Tabela 2). Concentração esta, bem abaixo da fornecida pelo NanoDrop, o que leva a concluir que há altas concentrações de RNA nas amostras de sementes. Os resultados foram satisfatórios na PCR, apenas quando foi utilizado DNA molde proveniente do endosperma da semente (Figura 3). Acredita-se que isso ocorra pelo fato desse tecido ser facilmente macerado e principalmente, por conter células triploides, comuns nas espécies angiospermas, sendo produto da fusão dos dois núcleos polares do óvulo e um núcleo do grão de pólen, o que confere às células deste tecido maior quantidade de DNA (RAVEN; EICHHORN; EVERT, 2014).

O protocolo HotSHOT é rápido, acessível e confiável para a extração de DNA em larga escala de tecido animal (TRUETT et al., 2000; MONTERO-PAU; GÓMEZ; MUÑOZ, 2008; ALASAAD et al., 2012; MEEKER et al., 2007; ALASAAD et al., 2008; WANG; STORM, 2006). Foi desenvolvido baseado em uma alternativa simples de lise alcalina e utilização de buffer de neutralização para se extrair DNA de células da mucosa bucal, células sanguíneas, sêmen e de amostras forense de humanos (RUDBECK; DISSING, 1998). Truett et al. (2000) extraíram DNA genômico de boa qualidade para a PCR em ratos, com algumas modificações no protocolo original, como a incubação das amostras em hidróxido de sódio em alta temperatura e ajuste do pH com solução Tris. De forma simples, o método HotSHOT utiliza apenas duas soluções, a solução de lise alcalina, composta de 25 mM de NaOH e 0,2 mM de EDTA e a solução de neutralização, com 40 mM Tris-HCl. É ideal para amostras pequenas de 0,2 cm ou 25 mg de tecido, o que permite sua execução com auxílio do termociclador, podendo se extrair DNA de 96 amostras de uma única vez. Testou-se este protocolo em tecido vegetal de *C. macrophyllum*, obtendo-se sucesso na PCR para as amostras de DNA oriundas do endosperma da semente, assim como o método de Kotchoni e Gachomo (2009). Tal resultado foi bastante surpreendente, uma vez que o protocolo HotSHOT é citado na literatura apenas para tecido animal.

A quantificação pelo NanoDrop mostrou concentrações muito altas de ácidos nucleicos para folha jovem, folha madura e semente, essa com 4.237 ng/ μ L (Tabela 1). Contudo, as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} foram muito abaixo do esperado para as três fontes de DNA (Tabela 1), o que mostra a presença de contaminantes nas amostras. A quantificação pelo QuBit resultou em concentração satisfatória de DNA apenas para as sementes (Tabela 2).

Gupta et al. (2012), extraíram DNA de sementes de mostarda indiana, arroz, trigo e algodão, com protocolos que utilizam SDS e CTAB como detergente. Na quantificação de suas amostras, eles obtiveram concentrações de ácidos nucleicos que variaram de 825,2 a 3.811,3 ng/ μ L, valores tão altos quanto os encontrados para as sementes de *C. macrophyllum*, com o protocolo HotSHOT.

Em animais, o método HotSHOT é utilizado com sucesso para a detecção de peixes transgênicos, que requer o isolamento de DNA de alto rendimento para a genotipagem via PCR (MEEKER et al., 2007). Este método é capaz de isolar DNA de boa qualidade de maneira rápida (10 a 20 minutos) a partir de várias fontes, até mesmo embriões e sêmen. Como um protocolo fácil, rápido, acessível, livre de reagentes tóxicos, o HotSHOT pode ser visto como uma alternativa viável, um método em potencial e inovador para a extração de DNA em tecidos vegetais.

As reações com as enzimas de restrição para a fragmentação do DNA de sementes, folhas e caule de *C. macrophyllum*, extraídos com *DNeasy Plant Mini Kit* (Figura 5), atestaram que este protocolo de extração é eficiente em produzir DNA de alta qualidade, livre de contaminações como proteínas e compostos secundários do metabolismo, passível da ação das enzimas de restrição. Resultado este, que comprova o potencial deste método como discutido anteriormente com base na Figura 1.

REFERÊNCIAS

- ALASAAD, S.; ROSSI, L.; MAIONE, S.; SARTORE, S.; SORIGUER, R. C.; PÉREZ, J. M.; RASERO, R.; ZHU, X. Q.; SOGLIA, D. HotSHOT Plus ThermalSHOCK, a new and eficiente technique for preparation of PCR-quality mite genomic DNA. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1455-1457, 2008.
- ALASAAD, S.; SÁNCHEZ, A.; GARCÍA-MUDARRA, J. L.; JOWERS, M. J.; PÉREZ, J. M.; MARCHAL, J. A.; ROMERO, I., GARRIDO-GARCÍA, J. A.; SORIGUER, R. C. Single-tube HotSHOT technique for the collection, preservation and PCR-ready DNA preparation of faecal samples: the threatened Cabrera's vole as a model. **European Journal of Wildlife Research**, v. 58, p. 345-350, 2012.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; VILLAREAL, C. F.; SOARES, M. B. P.; QUEIROZ, L. P.; AGUIAR, R. M. Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (LEGUMINOSAE). **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1137-1140, 2012.
- BRAMMER, S. P. Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 9 p. html (Embrapa Trigo. Documentos on line; 29). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p do29.htm>
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.
- GUPTA, R. K.; CHANDRASHEKAR, U. S.; CHAKRABARTY, S. K.; DADLANI, M. A simple modified method of DNA extraction from seeds for PCR amplifications. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 82, n. 1, p. 75-77, 2012.
- KOTCHONI, S. O.; GACHOMO, E. W. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plantas. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1633-1636, 2009.
- MEEKER, N. D.; HUTCHINSON, S. A.; HO, L.; TREDE, N. S. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. **BioTechniques**, v. 43, p. 610-614, 2007.
- MONTERO-PAU, J.; GÓMEZ, A.; MUÑOZ, J. Application of na inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. **Limnology and Oceanography: Methods** v. 6, p.218-222, 2008.
- PIAULINO, C. A.; CARVALHO, F. C. B.; ALMEIDA, B. C.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; BRITO, S. M. R. C. The stem bark extracts of *Cenostigma macrophyllum* attenuates tactile allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**. 2013. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2013.786096>.
- RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. 8ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2014. 876 p.

RUDBECK, L.; DISSING, J. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. **BioTechniques**, v. 25, p. 588-592. 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MAMIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, 1989.

SILVA, H. R.; SILVA, C. C. M.; CALAND NETO, L. B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes Químicos das Cascas do Caule de *Cenostigma macrophyllum*: Ocorrência de Colesterol. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SOUSA, C. C.; GOMES, S. O.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; BRITTO, F. B.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparison of methods to isolate DNA from *Caesalpinia férra*. **Genetics and Molecular Research**. v. 13, n. 2, p. 4486-4493, 2014.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-Jr, G. M.; AYRESM. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

TRUETT, G. E.; HEEGER, P.; MYNATT, R. L.; TRUETT, A. A.; WALKER, J. A.; WARMAN, M. L. Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). **BioTechniques**, v. 29, p. 52-54, 2000.

VIANA, A. F. S. C.; FERNANDES, H. B.; SILVA, F. V.; OLIVEIRA, I. S.; FREITAS, F. F. B. P.; MACHADO, F. D. F.; COSTA, C. L. S.; ARCANJO, D. D. R.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. acuminata Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 316-323, 2013.

WANG, Z.; STORM, D. R. Extraction of DNA from mouse tails. **BioTechniques**, v. 41, p. 410-412, 2006.

CAPÍTULO II

Folhas velhas como fonte de DNA para estudos moleculares em *Cenostigma macrophyllum* (Fabaceae: Caesalpinioideae)¹

¹Artigo: “*Old leaves as a source of DNA for molecular studies in Cenostigma macrophyllum (Fabaceae) a native tree species of tropical northeastern Brazil*”.

RESUMO

A extração de DNA em plantas consiste no passo chave para os estudos moleculares. A folha jovem é a fonte de DNA mais utilizada nos estudos científicos, pois além do tecido foliar jovem apresentar o maior número de células em divisão, possui também baixa concentração de metabólitos secundários. Os compostos do metabolismo secundário dos vegetais são conhecidos por oxidar os ácidos nucleicos e também por se associarem a eles, dificultando assim o processo de isolamento e inibindo a ação de enzimas como a Taq polimerase e endonucleases de restrição, que não conseguem ter acesso às moléculas. Em se tratando de espécies arbóreas, a coleta de folhas jovens nem sempre é fácil. Para *Cenostigma macrophyllum*, espécie arbórea e arbustiva endêmica do nordeste do Brasil, a coleta de folhas jovens pode ser uma tarefa árdua, principalmente nas populações naturais. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da idade da folha de *C. macrophyllum* na extração de DNA. Folhas jovens e folhas velhas foram coletadas em áreas urbanas da cidade de Teresina-PI e submetidas à extração com o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A quantificação do DNA e a sua pureza foram avaliadas pelo espectrofotômetro no NanoDrop ND-1000, pelo fluorímetro QuBit 2.0 (Invitrogen) e por gel de agarose a 0,8% e os resultados mostraram concentrações de DNA satisfatórias tanto para as folhas jovens quanto para as folhas velhas. Todas as amostras exibiram DNA de alto peso molecular, com a razão de absorbância em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), próxima ao esperado de 1,8 a 2,0. O teste de amplificação via PCR foi bem sucedido para os dois tipos de folhas, resultado este que comprova a eficiência das folhas de diferentes idades como fonte de DNA para estudos moleculares em *C. macrophyllum*.

Palavras-chave: Caneleiro, extração de DNA, DNA genômico, metabólitos secundários

ABSTRACT

The DNA extraction in plants is the key step for molecular studies. The young leaf is the source of DNA used in most scientific studies, because besides the young leaf tissue had the highest number of dividing cells, also has low concentration of secondary metabolites. The compounds of secondary metabolism of plants are known to oxidize nucleic acids and also for associating with them, thus hindering the process of isolation and inhibiting the action of enzymes such as Taq polymerase and restriction endonucleases that do not have access to molecules. In terms of tree species, collection of young leaves is not always easy. To *Cenostigma macrophyllum*, tree and shrub species endemic to northeastern Brazil, the collection of young leaves can be an arduous task, especially in natural populations. In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of age *C. macrophyllum* leaf in DNA extraction. Young leaves and old leaves were collected in urban areas of the city of Teresina-PI and subjected to extraction with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). The DNA quantification and purity were assessed by spectrophotometer in NanoDrop ND-1000, Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen) and by agarose gel 0.8% and showed satisfactory results for both DNA concentrations young leaves and for the old leaves. All samples exhibited high molecular weight DNA with the ratio of absorbance at 260 and 280 nm (A_{260}/A_{280}) close to the expected 1.8 to 2.0. The amplification via PCR test was successful for both types of sheets, a result which confirms the efficiency of the leaves of different ages as a source of DNA for molecular studies in *C. macrophyllum*.

Keywords: Caneleiro, DNA extraction, genomic DNA, secondary metabolites

INTRODUÇÃO

A folha jovem é a principal fonte de DNA para estudos moleculares em plantas, pois além do tecido foliar jovem apresentar o maior número de células em divisão, possui também baixa concentração de metabólitos secundários. Ao longo do tempo, normalmente, as folhas acumulam compostos químicos em suas células, dentre outras funções, estes compostos constituem um importante mecanismo de defesa nas plantas, uma vez que as protegem contra o ataque de insetos herbívoros, impedem o crescimento de microrganismos em casos de injúrias (GOTTLIEB et al., 1996; MARTINS et al., 1998).

Os compostos do metabolismo secundário dos vegetais são conhecidos por dificultarem o processo de extração de DNA, comprometendo inclusive, sua qualidade, pois podem levar à oxidação dos ácidos nucleicos de maneira irreversível e podem também se ligar ao DNA de modo que as enzimas de restrição e a *Taq* polimerase sejam impedidas de atuar e realizar suas atividades no DNA molde (SAHA et al., 1997; MOREIRA; OLIVEIRA, 2011).

A coleta de folhas jovens em muitos casos tende a ser dificultada pelo elevado porte das espécies arbóreas, desta forma, a possibilidade de utilizar material vegetal proveniente de outro tecido vegetal, que apresente uma coleta mais acessível, como por exemplo, o uso de folhas mais velhas, parte do caule ou mesmo sementes, torna-se uma opção interessante, como fonte de DNA úteis em estudos moleculares.

Cenostigma macrophyllum (Fabaceae: Caesalpinioideae), espécie arbórea nativa e endêmica do Cerrado da região nordeste do Brasil, pode ser encontrada também na caatinga. É conhecida popularmente como caneleiro, canela-de-velho, maraximbé e fava do campo. Nos últimos anos, esta espécie tem sido foco de estudos pelas suas características farmacológicas. Suas folhas, as cascas do caule e flores apresentam indicação popular para o tratamento de afecções estomacais e intestinais. Dentre as propriedades comprovadas em estudos científicos estão: anti-inflamatórias, analgésicas, antimicrobiana e antiulcerogênica (SILVA et al., 2007; SOUSA et al., 2007). Suas propriedades atraem o interesse da indústria farmacêutica e cosmética, em função das atividades biológicas que seus constituintes químicos apresentam (PIAULINO et al., 2013; VIANA et al., 2013; COELHO et al., 2014).

Apesar da sua importância medicinal, não há relatos na literatura sobre estudos moleculares de *C. macrophyllum*, que descrevam a influencia de diferentes tecidos desta planta na extração de DNA, o que poderia ser útil para estudos moleculares subsequentes, como de diversidade genética. A possibilidade de se encontrar nas folhas mais velhas uma

fonte de DNA de alta qualidade pode facilitar o processo de coleta do material nas espécies arbóreas, principalmente para estudos de diversidade genética, onde várias populações precisam ser amostradas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da idade da folha de *C. macrophyllum* na extração de DNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Folhas jovens e folhas velhas de seis indivíduos adultos de *C. macrophyllum* foram coletadas em áreas urbanas da cidade de Teresina-PI, Brasil (Figura 1). As amostras, acondicionadas em isopor com gelo, foram conduzidas ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio Norte, em Teresina-PI, onde foram mantidas a -20°C até o momento da extração de DNA.

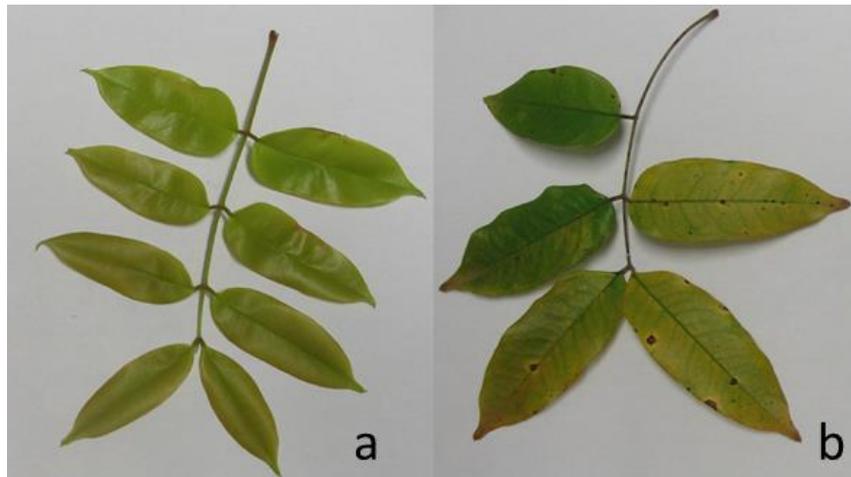


Figura 1 - Folhas de *C. macrophyllum* a) Folha Jovem b) Folha Velha

Extração, Quantificação e Amplificação do DNA

Para a extração do DNA genômico, utilizou-se o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) e 100 mg do tecido vegetal foi empregado. A quantificação do DNA foi realizada pelo espectrofotômetro no NanoDrop ND-1000 a 260 nm (SAMBROOK; FRITSCH; MAMIATIS, 1989) e pelo fluorímetro QuBit 2.0 (Invitrogen), e a pureza do DNA avaliada pela razão de absorbância em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

A estimativa da concentração e integridade do DNA extraído foi realizada também pela eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com SYBRSafe (Invitrogen), utilizando como padrão de análise o DNA- λ diluído na concentração de 100 ng/ μ L. O DNA extraído foi testado pela amplificação via PCR com o par de iniciadores para a subunidade maior da proteína RuBisCo (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) codificada pelo genoma cloroplastídico (cpDNA).

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 10 μ L, contendo aproximadamente 15 ng do DNA molde, 1,5 μ L de buffer 10x (Thermo Fisher Scientific Inc), 25 mM de MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Inc), 200 mM dNTPs (New England BioLabs Inc.), 0,75 μ L de primer, 2,0 μ L de água ultrapura, 1 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific Inc). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Os ciclos das PCRs foram iniciados com uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos compostos por etapa de desnaturação a 95°C por um minuto, temperatura de anelamento dos primers de 60°C por um minuto e etapa de extensão a 72° por um minuto, encerrando com a extensão final à 72°C por 4 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose 1,5% e corados com SYBRSafe (Invitrogen) para visualização em transluminador UV.

RESULTADOS

Para as folhas jovens as concentrações de ácidos nucleicos variaram de 17,7 a 192,9 ng/ μ L entre os seis indivíduos analisados e para as folhas velhas, a variação foi de 108,0 a 435,8. As razões A260/A280 e A260/A230 que determinam a pureza do material genético foram satisfatórias. Onde, a razão A260/A280 permaneceu próxima ao recomendado, entre 1,8 e 2,0, o que determina ácidos nucleicos livres da presença de proteínas e a razão A260/A230, que indica a presença de impurezas nas amostras, como fenóis, polissacarídeos e outros componentes do metabolismo secundário das células, manteve-se também próxima ao desejado, entre 1,8 e 2,2 (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantificação e purificação pelo NanoDrop das amostras de folhas jovens e folhas velhas de *C. macrophyllum*.

Fonte de DNA	Indivíduos	ng/ μ L	Razão A ₂₆₀ /A ₂₈₀ nm	Razão A ₂₆₀ /A ₂₃₀ nm
Folhas Jovens	1	26,5	1,57	2,30
	2	40,9	1,74	2,19
	3	106,9	1,80	2,09
	4	192,9	1,88	2,45
	5	180,6	1,94	1,79
	6	17,7	1,78	1,83
Folhas Velhas	1	148,1	1,86	2,33
	2	435,8	1,91	1,86
	3	164,4	1,77	2,25
	4	108,0	1,86	2,44
	5	133,6	1,77	2,14
	6	120,3	1,94	2,32

A quantificação pelo fluorímetro QuBit 2.0 (Invitrogen), especificamente para DNA (Tabela 2) resultou em valores de concentrações menores que os gerados pelo NanoDrop, o que leva a crer que há a presença de RNA nas amostras extraídas pelo *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). Para as folhas jovens, as concentrações de DNA variaram entre 10,8 e 84,4 ng/ μ L e para as folhas velhas, de 49,7 a 94,4 ng/ μ L.

Tabela 2 - Quantificação do DNA pelo Fluorímetro QuBit 2.0 dos seis indivíduos analisados de *Cenostigma macrophyllum* em ng/ μ L.

Fonte de DNA	1	2	3	4	5	6
FJ	10,8	84,4	50,8	46,4	45,2	14,0
FV	70,0	94,4	49,7	61,8	86,0	79,6

FJ: Folha jovem, FV: Folha velha

A estimativa da concentração e integridade do DNA pela eletroforese em gel de agarose mostrou que a extração foi bem sucedida para as folhas jovens e folhas velhas dos seis indivíduos de *C. macrophyllum*. O DNA extraído exibiu boa qualidade (Figura 2A). A

amplificação via PCR do fragmento do gene *rbcL* do cpDNA ocorreu com sucesso para todos indivíduos, tanto para as folhas jovens quanto para as folhas velhas (Figura 2B).

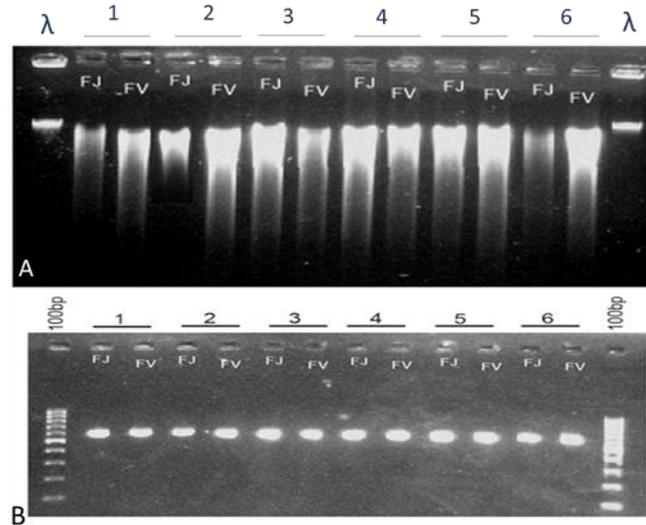


Figura 2 - **A)** DNA genômico de *C. macrophyllum* dos seis indivíduos. Folha jovem (FJ) e folha velha (FV). **B)** Amplificação do gene *rbcL* nos seis indivíduos. Folha jovem (FJ) e folha velha (FV).

DISCUSSÃO

As espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae (Fabaceae) são conhecidas por apresentarem altas concentrações de compostos secundários com propriedades farmacêuticas. O Cerrado brasileiro, bioma considerado um dos 34 hotspots da biodiversidade mundial, se destaca por apresentar um número expressivo de espécies desta subfamília usadas na medicina popular (MITTERMEIER et al., 2004). De acordo com a literatura, as folhas das plantas acumulam ao longo do tempo metabólitos químicos que são utilizados como mecanismo de defesa sob as condições adversas do ambiente, como infecções, ferimentos, ataque de insetos herbívoros onde atuam como dissuasivos de ingestão (NACZK; SHAHIDI, 2004). Estes compostos secundários do metabolismo conferem às espécies vegetais propriedades farmacológicas que despertam o interesse da indústria farmacêutica e cosmética (MATSUKI et al., 2004).

Cenostigma macrophyllum é uma espécie rica em compostos fenólicos que apresentam diversos papéis biológicos como a capacidade de impedir o crescimento de colônias de certas bactérias, ação antinociceptiva, gastroprotetora (SANTOS, 2001; COSTA,

2005; SOUSA, et al., 2007; SILVA et al., 2007; PIAULINO et al., 2013; VIANA et al., 2013 COELHO et al., 2014). Os flavonoides são compostos fenólicos frequentes nessa espécie e apresentam ação antioxidante, importante por interceptar a ação dos radicais livres nas células (SCHENKEL et al., 2007).

Embora tragam benefícios para os organismos vivos, os compostos secundários do metabolismo tendem a dificultar os processos de extração e análise de DNA nas plantas (SAHA et al., 1997). John (1992), afirma que estes compostos oxidam o DNA de maneira irreversível, além de inibir a ação de enzimas, como as endonucleases de restrição e a Taq polimerase, por se ligarem à molécula de DNA. Este fato inviabiliza a utilização de folhas velhas como fonte de DNA de alta qualidade para estudos moleculares em função da presença significativa desses compostos que são liberados durante a lise celular.

Moreira e Oliveira (2011), analisaram o efeito da idade das folhas de *Dimorphandra mollis*, espécie arbórea do Cerrado brasileiro, na extração de DNA com o protocolo CTAB padrão (Doyle e Doyle, 1987). A quantificação das amostras em gel de agarose a 0,8%, mostrou ausência de DNA para as folhas velhas e as amplificações via PCR com primers de RAPD aconteceram somente nas amostras de folhas jovens. Os autores concluíram que a presença de grandes concentrações de compostos secundários nas folhas velhas oxidou o DNA e que a ausência de bandas na PCR pode estar associada com a presença dos compostos químicos presentes nas folhas usadas.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que isto não é uma regra para todas as espécies vegetais. Em *C. macrophyllum*, o DNA foi extraído com sucesso tanto de folhas jovens quanto de folhas velhas. As folhas velhas, por sinal, mostraram-se excelentes como fonte de DNA de alto peso molecular. As quantificações realizadas por espectrofotometria no NanoDrop (Tabela 1), por fluorimetria, pelo QuBit 2.0 (Tabela 2) e em gel de agarose a 0,8% (Figura 2A) mostraram a presença de concentrações satisfatórias de DNA de boa qualidade para estudos moleculares. As amplificações via PCR vêm atestar estes resultados (Figura 2B), comprovando a eficiência das folhas de diferentes idades como fonte de DNA para esta espécie.

Uma possível justificativa para estes resultados pode se basear no fato de que os compostos fenólicos biologicamente ativos, em especial os flavonoides presentes expressivamente nas folhas de *C. macrophyllum*, nesta situação, exerceram ação antioxidante, atuando de forma significativa na manutenção da integridade das células e protegendo os ácidos nucléicos de possíveis degradações em decorrência da idade das folhas. O que condiz com a literatura que afirma que as substâncias antioxidantes presentes nos vegetais podem

prevenir danos oxidativos a moléculas importantes como o DNA, proteínas e lipídeos de membrana (GORETTA et al., 2004), além de indicar um alto potencial bioativo dos extratos de *C. macrophyllum*.

A extração de DNA é uma etapa crucial para as análises moleculares e pode ser obtida a partir de folhas de diferentes idades, sejam frescas ou desidratadas. A escolha da fonte de DNA é específica para cada espécie e a composição química do tecido vegetal utilizado direcionará o método a ser adotado, sejam folhas jovens, folhas velhas, caules, sementes ou raiz. Desta forma, a extração DNA de alta qualidade em espécies vegetais requer testes com diferentes tecidos e com diferentes protocolos, uma vez que, o método que funciona para uma espécie não necessariamente se mostrará eficiente para outra. Cheng et al. (2003), extraíram DNA de amostras de folhas jovens e folhas velhas de várias espécies de Citrus que contém altos níveis de polissacarídeos, incluindo uma etapa de purificação com éter saturado com água e 1,25 M NaCl nos protocolos CTAB e SDS. Suas amostras tiveram rendimento que variou de 50-500 µg/g de DNA, passível da ação da enzima Taq polimerase via PCR e análise de RFLP.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, para *C. macrophyllum*, as folhas velhas constituem excelentes fontes de DNA, tanto quanto as folhas jovens.

REFERÊNCIAS

- CHENG, Y. J.; GUO, W. W.; YI, H. L.; PANG, X. M.; DENG, X. An Efficient Protocol for Genomic DNA Extraction from *Citrus* Species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p. 177-178, 2003.
- COELHO, N. P. M. de F.; RANIERO, L.; COSTA, C. L. S.; MAIA FILHO, A. L. M.; MARTINS, M.; MARTIN, A. A.; ARISAWA, E. A. L. FT-Raman spectroscopic study of skin wound healing in diabetic rats treated with *Cenostigma macrophyllum* Tul. **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 47-53, 2014.
- COSTA, C. L. S. **Constituintes Químicos e Atividade Antibacteriana, Antiulcerogênica e Hepatoprotetora da *Cenostigma macrophyllum* Tul var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae)**. 137 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2005.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- GORETTA, L. A.; CARRASQUEDO, F.; FRAGA, C. G. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. **Clinica Chimica Acta**. Great Britain, v. 349, n. 1-2, p. 97-103, 2004.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. de M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Ed da UFRJ, 1996.
- JOHN, M. E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 2381, 1992.
- MARTINS, E. R.; DE CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa, Minas Gerais: Ed da UFV, 1998.
- MATSUKI, S.; SANO, Y.; KOIKE, T. Chemical and physical defence in early and late leaves in three heterophyllous birch species native to northern Japan. **Annals of Botany**, v. 93, p. 141-147, 2004.
- MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, J.; PILGRIM, J. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. Cemex, Conservation International and Agrupacion Sierra Madre, Monterrey, 2004.
- MOREIRA, P. A.; OLIVEIRA, D. A. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. **Genetics Molecular Research**, v. 10, n. 1, p. 353-358, 2011.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatography**. Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- PIAULINO, C. A.; CARVALHO, F. C. B.; ALMEIDA, B. C.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; BRITO, S. M. R. C. The stem bark extracts of *Cenostigma macrophyllum* attenuates

tactile allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**. 2013. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2013.786096>.

SAHA, S.; CALLAHAN, F. E.; CREECH, J. B. Cotton improvement effect of lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA and protein. **The Journal of Cotton Science**, v. 1, p. 10-14, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MAMIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, 1989.

SANTOS, F. J. B. **Constituintes químicos da fase hidroalcoólica e atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico de folhas da *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae)**. 148 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2001.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: Simões, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. Ed. 6, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1104p.

SILVA, H. R.; SILVA, C. C. M.; CALAND NETO, L. B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes Químicos das Cascas do Caule de *Cenostigma macrophyllum*: Ocorrência de Colesterol. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-Jr, G. M.; AYRESM, C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

VIANA, A. F. S. C.; FERNANDES, H. B.; SILVA, F. V.; OLIVEIRA, I. S.; FREITAS, F. F. B. P.; MACHADO, F. D. F.; COSTA, C. L. S.; ARCANJO, D. D. R.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. M. Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 316-323, 2013.

CAPÍTULO III
Diferenciação estrutural interespecífica e intraespecífica nas espécies
arbóreas *Cenostigma macrophyllum* e *Cenostigma tocantinum*
(Fabaceae:Caesalpinioideae)

Elisa Aparecida Alves Paiva ^{1,2}, Geice Ribeiro da Silva ^{1,2}, Maria Claudene Barros ³, Elmary da Costa Fraga ³, Fabio Mendonça Diniz ^{4,*}

¹ Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga, Teresina, PI, 64049-550, Brazil

² Universidade Federal do Piauí, Northeast Biotechnology Network RENORBIO, Teresina, PI, 64049-550, Brazil

³ Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Centro de Estudos Superiores de Caxias, Praça Duque de Caxias S/N, 65600, Caxias, MA, Brasil.

⁴ EMBRAPA Meio-Norte, Laboratory of Molecular Biology e Biotechnology, CP: 01, CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brazil.

RESUMO

Cenostigma é um pequeno gênero de árvores e arbustos nativo do Brasil, pertencente à família Fabaceae, a subfamília Caesalpinioideae e à tribo Caesalpinieae, formado por duas espécies, *C. macrophyllum* e *C. tocaninum*, que se distribuem nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Ambas as espécies são empregadas na ornamentação de praças e avenidas devido ao seu potencial para a arborização. *C. macrophyllum* é também utilizada pela medicina popular, por suas propriedades farmacológicas e a ação antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana e antiulcerogênica dos extratos de suas folhas, caules e sementes, comprovadas cientificamente. Neste estudo, foi realizado o sequenciamento de uma região intergênica do genoma cloroplástico (*cpDNA*), *psbB-psbF*, com o intuito de conhecer a diversidade genética em populações naturais dessas espécies, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo e conservação. Foram coletadas amostras de 11 populações naturais de *C. macrophyllum* nos estados do Piauí e Maranhão. As amostras de *C. tocaninum* foram coletadas na área urbana da cidade de Manaus-AM. O sequenciamento de 762 pb dos 123 indivíduos revelou 12 sítios polimórficos, sendo 9 singletons e 3 parsimônia-informativo. Quatro haplótipos foram detectados evidenciando que essa região é bastante conservada entre as duas espécies. A árvore *neighbor-joining* e a rede de haplótipos revelaram quatro grupos, sendo que dois desses foram mais frequentes. Foi confirmada a distinção entre *C. macrophyllum* e *C. tocaninum*, além da existência de diferenças entre as populações de *C. macrophyllum* das regiões norte e sul dos estados do Piauí e Maranhão. A subdivisão de *C. macrophyllum* em dois taxa suporta a existência da variedade *acuminata*, descrita por Freire (1994), e uma variedade ainda não descrita. Tal separação, com essas duas variedades, sugere um processo incipiente de especiação. Os resultados deste estudo, de diferenciação interespecífica e subestruturação intraespecífica fornecem uma base consistente para futuros estudos a respeito dos conceitos da genética de populações para o gênero *Cenostigma*.

Palavras chave: caneleiro, sequenciamento, *cpDNA*

ABSTRACT

Cenostigma is a small genus of trees and shrubs native of Brazil belongs to the Fabaceae family, subfamily Caesalpinioideae and Caesalpinieae tribe formed by two species, *C. macrophyllum* and *C. tocaninum*, which are distributed in the North and Northeast of Brazil. Both species are used in ornamental squares and avenues because of its potential for afforestation. *C. macrophyllum* is also used in folk medicine for their pharmacological properties and anti-inflammatory, analgesic, anti-microbial and anti-ulcer extracts of its leaves, stems and seeds are scientifically proven. In this study, we performed the sequencing of the intergenic region of chloroplast genome (*cpDNA*), *psbB-psbF*, in order to know the genetic diversity in natural populations of these species in order to contribute to the development of effective management and conservation strategies. Samples were collected from 11 natural populations of *C. macrophyllum* in the states of Piauí and Maranhão. Samples of *C. tocaninum* were collected in the urban area of the city of Manaus-AM. Sequencing of 762 bp of the 123 individuals revealed 12 polymorphic sites, 9 singletons and 3 parsimony-informative. Four haplotypes were detected showing that this region is highly conserved between the two species. The tree and neighbor-joining haplotype network revealed four groups, two of which were more frequent. The distinction was confirmed between *C. macrophyllum* and *C. tocaninum*, besides the existence of differences between populations of *C. macrophyllum* the northern and southern regions of the states of Piauí and Maranhão. The subdivision of *C. macrophyllum* two rate acuminata supports the existence of the variety described by Freire (1994), and a variety yet described. Such separation with these two varieties, suggests an incipient process of speciation. The results of this study, interspecific and intraspecific differentiation substruturação provide a consistent basis for future studies on the genetics of populations concepts for *Cenostigma* genre.

Keywords: Caneleiro, sequencing, *cpDNA*

INTRODUÇÃO

Cenostigma é um gênero de árvores e arbustos nativo do Brasil, pertencente à família *Fabaceae*, a subfamília *Caesalpinioideae* e à tribo *Caesalpinieae*. Com base em estudos morfológicos, Warwick e Lewis (2009) evidenciaram a ocorrência de duas espécies, *Cenostigma macrophyllum* Tul. (sinonímia *C. gardnerianum*) e *Cenostigma tocantinum* Ducke, que estão distribuídas nas formações de mata, cerrado e caatinga das regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Estudos sobre a diversidade genética das espécies arbóreas nativas do Cerrado brasileiro são escassos, no entanto são importantes, pois permitem traçar estratégias de manejo e conservação que visem garantir a preservação dos seus recursos genéticos. A conservação da variabilidade genética visa à manutenção do potencial adaptativo/evolutivo das espécies, uma vez que esta variabilidade é condição essencial para a adaptação às mudanças ambientais. Onde a variabilidade se faz presente, as chances de uma espécie resistir a qualquer pressão que o meio imponha são bem maiores, isso garante a sua sobrevivência e é importante para a persistência evolutiva das espécies.

O Cerrado é um dos biomas mais ricos em biodiversidade do mundo e continua pouco estudado. É conhecido como a savana mais rica do mundo, especialmente em número de espécies vegetais presentes, apresenta alto índice de endemismo e muitas espécies adaptadas às condições de estresse (MYERS, et al., 2000). Sua área original foi reduzida em mais de 50% nos últimos anos, o que o tornou então um dos principais *hotspots* globais para a conservação da biodiversidade (KLINK; MACHADO, 2005; PENNINGTON et al., 2006; WERNECK, 2011).

As técnicas da biologia molecular podem ser empregadas para a obtenção de informações genéticas de espécies vegetais, por meio de, por exemplo, marcadores moleculares. Estes constituem uma poderosa ferramenta para descrever os padrões de variabilidade genética dentro e entre populações naturais, fornecendo assim subsídios para a elaboração das estratégias de conservação. A caracterização da estrutura genética populacional é fundamental para identificar unidades de conservação.

Para as plantas, marcadores moleculares provenientes do genoma cloroplastídico (*cpDNA*) estão entre os mais propícios para estudos de filogenia e genética populacional (LORENZ-LEMKE et al., 2005; MILLER; SCHAAL, 2005). As sequências de *cpDNA* evoluem lentamente se comparadas com as sequências do DNA nuclear, por isso vêm sendo empregadas com frequência em estudos genéticos por conta da sua estabilidade estrutural, seu

padrão de herança uniparental e sua taxa de mutação (HOWE et al., 2003). Apesar de ser um genoma relativamente conservado, variações no *cpDNA* têm sido relatadas para muitas espécies de plantas (SCHAAL et al., 1998) o que permite estudar a estrutura genético-populacional e reconstruir a filogenia em nível intraespecífico e inferir rotas históricas de colonização como consequência da sua herança materna na maioria das angiospermas (FUJII et al., 1997; NEWTON et al., 1999). A variação no *cpDNA* pode ser observada dentro de uma área relativamente restrita e dessa forma possibilita a compreensão das diferenças filogenéticas entre populações dentro de uma determinada escala geográfica (HONJO et al., 2004).

Neste estudo, a região espaçadora intergênica *psbB-psbF* do *cpDNA* foi utilizada como marcador (HAMILTON, 1999), sendo a região amplificada, flanqueada por éxons, o que fornece locais conservados de emparelhamento dos iniciadores. Por se tratar de uma região não codificante do genoma cloroplastídico, esta se constitui em uma região potencialmente favorável para a detecção de variações intra e interespecífica no genoma das espécies do gênero *Cenostigma*. Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo é inferir as relações filogenéticas entre as espécies, além de avaliar os níveis de variabilidade genética e estrutura populacional da espécie *C. macrophyllum* com base no fragmento estudado, visando contribuir futuramente para o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e extração de DNA

Folhas de *Cenostigma macrophyllum* foram coletadas em populações naturais nos estados do Piauí e Maranhão (Tabela 1 e Figura 1). As amostras de *Cenostigma tocantinum* foram coletadas na área urbana da cidade de Manaus-AM. Após a coleta, as folhas foram armazenadas em sacos de papel devidamente identificados e levadas à estufa a 37°C, por 24 horas para desidratação. Depois de desidratadas, as folhas foram acondicionadas em local seco, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, até o momento da extração de DNA. As populações de Altos-PI e de São Raimundo Nonato-PI foram coletadas em áreas de reserva ambiental, Reserva dos Palmares e Serra da Capivara, respectivamente, com a autorização do Ministério do Meio Ambiente – MMA e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, de número 47118-2.

Tabela 1 – Informações sobre os locais de coleta das amostras de *Cenostigma macrophyllum* e *C. tocantinum*.

Locais de Coleta	Estado do Brasil	Código do Local	n	Coordenadas Geográficas
Zoobotânico	Piauí	THE-Zoo	12	S 05°02'17,0" W 042°46'41,9"
Teresina Parque da Cidade	Piauí	THE-Pc	11	S 05°03'19,1" W 042°48'37,4"
CCA-UFPI	Piauí	THE-Cca	12	S 05° 02'47,6" W 042°46'54,9"
Miguel Leão	Piauí	MIL-Pi	11	S 05°41'30,2" W 042°43'36,5"
Floriano	Piauí	FLO-Pi	12	S 06°58'36,4" W 043°05'26,7"
São Raimundo Serra da Capivara	Piauí	SEC-Pi	12	S 08°50'15,3" W 042°32'52,1"
Nonato Barretinho	Piauí	BAR-Pi	11	S 08°49'06,6" W 042°30'55,7"
Santana do Piauí	Piauí	SAP-Pi	7	S 06°56'02,5" W 41°31'13,5"
Altos – Reserva dos Palmares	Piauí	ALT-Pi	9	S 05°03'28,82" W 42°35'33,77"
Codó	Maranhão	COD-Ma	10	S 04°37'28,6" W 043°54'00,7"
Timon	Maranhão	TIM-Ma	4	S 05°02'31,8" W 042°54'18,4"
Manaus	Amazonas	MAN-Am	12	S 02°53'17" W 59°57'56,0"

n: tamanho da amostra

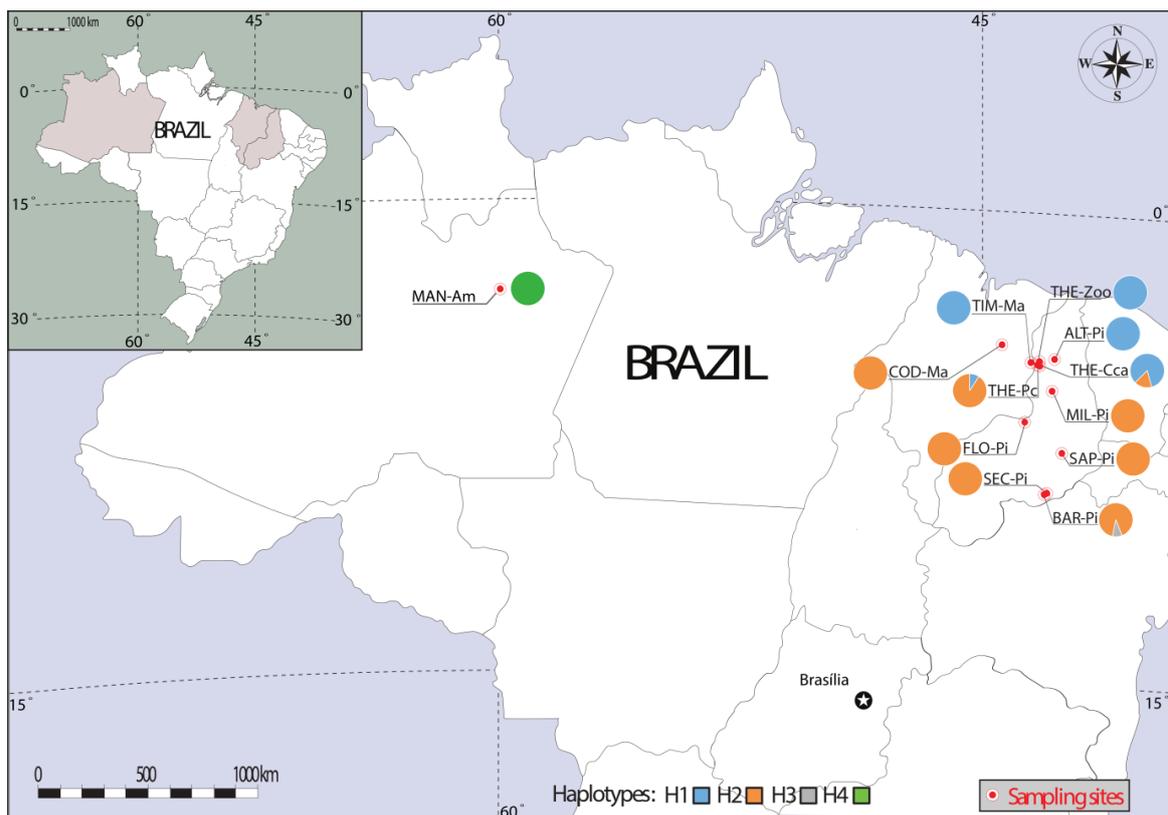


Figura 1 – Mapa dos locais de amostragem para as espécies do gênero *Cenostigma* no Brasil. Veja a Tabela 1 para as abreviaturas dos locais amostrados.

A extração do DNA foi realizada com o kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), quando 0,25 g do tecido seco foi pesado, cortado em pedaços pequenos e colocado em tubos de Precellys com cinco esferas de vidro de 3 mm. Em seguida, foi adicionada a solução de lise (AP1) e levado ao Precellys a 5700 rpm por dois ciclos de oito segundos, com intervalo de dez segundos entre cada ciclo. Depois, as amostras seguiram para o banho-maria a 65°C, no qual permaneceram por 30 minutos. Posteriormente, foi dada continuidade no processo de extração seguindo o protocolo descrito pelo kit comercial.

Amplificação do DNA e sequenciamento

A região espaçadora intergênica do cpDNA foi amplificada por um par de primer universal *psbB-psbF*, desenvolvida para a espécie *Corythophora alta*. A sequência amplificada se trata de uma região flanqueada por exons, o que fornece locais conservados de emparelhamento dos iniciadores (Tabela 2).

Tabela 2 - Iniciadores oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR e sequenciamento da região intergênica do cpDNA do gênero *Cenostigma*.

Iniciadores (5' – 3')	Sequências	Ta *	Localização no cpDNA	Referência
<i>psbB</i>	GTTTACTTTTGGGCATGCTTCG	53°	76299	HAMILTON,
<i>psbF</i>	CGCAGTTCGTCTTGGACCAG	C	77151	1999

*Ta: temperatura de anelamento.

As reações de amplificação via PCR, foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), programado com etapa inicial de desnaturação de 1 minuto a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto para o anelamento dos iniciadores, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O volume final da reação foi de 20 µL contendo aproximadamente 15 ng de DNA, 0,25 mM de dNTP, 1U de HotStart Taq DNA polimerase (Promega), 0,2 µM de iniciadores, 3,0 mM de MgCl₂, 2,0 µL de tampão 1× e H₂O ultrapura.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5 x conduzido a 80 V por 120 minutos e corado com GelRed-Biotium 10.000 × (Uniscience). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com o marcador DNA Ladder 1 Kb e 100bp (Invitrogen), sendo visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados.

Os produtos de PCR foram purificados com colunas de purificação de PCR Invitek®, a fim de remover o excesso de iniciadores e de nucleotídeos, e concentrar os fragmentos amplificados por PCR. Os produtos de amplificação purificados foram utilizados como DNA molde, nas reações de sequenciamento. O processo de sequenciamento foi realizado utilizando o ABI Prism Big Dye™ Ready Mix (Applied Biosystems) e o iniciador psbB em um Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos do sequenciamento foram purificados utilizando isopropanol para remover os terminadores fluorescentes que não reagiram. A análise dos produtos de sequenciamento foi realizada no ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram sequenciados na direção forward, as sequências ambíguas e de difícil interpretação foram excluídas. Todas as sequências de nucleotídeos foram submetidas ao banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information).

Análise de dados das sequências

As sequências *forward* para cada indivíduo foram verificadas manualmente empregando o editor de sequência Chromas versão 2.23 (Technelysium). As sequências de nucleotídeos homólogas de todas as amostras foram alinhadas usando o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994; THOMPSON et al., 1997), no editor Bioedit versão 7.2.5 (HALL, 1999). Os alinhamentos foram checados e as sequências corrigidas quando necessário.

A fim de evitar incoerências na reconstrução filogenética causadas pela saturação de substituição, foi observada por meio da comparação das estimativas de metade do índice de saturação teórica esperada ao assumir a saturação completa (ISS.c, valor crítico) com o índice de saturação observado (ISS) empregando o software Dambe programa v 5.2 (FU, 1997; XIA; XIE, 2001).

Para verificar alguns índices referente ao grau de diversidade genética, empregando o programa Dnasp v.5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009), foram estimados número de haplótipos, número de sítios polimórficos, diversidade haplotípica (H_d) e diversidade nucleotídica (π) (NEI, 1987). Para estimar a taxa de transição e transversão bias e o número médio de

diferença par a par (M), foram utilizados os programas Mega v.7 (KUMAR et al., 2016) e Arlequin v3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), respectivamente.

A estruturação populacional em função da variação da frequência dos haplótipos do cpDNA (DNA cloroplastídico) foi verificada pela análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992; TAJIMA, 1998) bem como pelos valores F_{ST} par-a-par entre as populações, estimados empregando o programa Arlequin, pelo método de Weir e Cockerham, 1984. De forma a dar maior veracidade aos resultados, empregando o mesmo programa, a diferença média corrigida par-a-par D_A ($(P_{iXY} - (P_{iX} + P_{iY})/2)$) entre as populações também foi calculada, em que P_{iXY} é a média das diferenças par-a-par entre as populações X e Y, sendo P_{iX}/P_{iY} as diferenças par-a-par dos indivíduos amostrados dentro das populações X e Y, respectivamente.

Verificando outros estimadores para o padrão de estruturação genética populacional, empregando os dados de cpDNA, por meio do programa Permut (disponível no link: <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/PermutCpSSR/>), também foram analisados o grau de diversidade intrapopulacional (HS), total (HT), e diferenciação a nível de subdivisão populacional (GST) e diferenciação influenciada por ambas as frequências dos haplótipos e as distâncias genéticas entre os haplótipos (NST), como descrito por Pons e Petit (1996).

As sequências de cpDNA de *C. macrophyllum* e *C. tocaninum* alinhadas foram importadas para o MEGA v.7 (TAMURA, 1992; TAMURA et al., 2013), para a estimativa da divergência entre haplótipos. Sítios com lacunas de alinhamento e dados com gaps foram omitidos das análises. Foi construído o dendrograma baseado na distância genética par-a-par entre os indivíduos, estimadas também pelo programa Mega v.7, usando o método estatístico Neighbor-Joining, empregado para examinar as relações entre os indivíduos. Para verificar o nível de confiança e a consistência de nós (topologia em árvore) derivada da análise filogenética, 1000 replicações de bootstrap do conjunto de dados originais foram realizados (FELSENSTEIN, 1985; BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999; ROGERS; HARPENDING, 1992). Anteriormente, foi realizado, no próprio programa, teste do melhor modelo de seleção de substituição nucleotídica de forma a construir a árvore filogenética mais adequada ao conjunto de dados amostrados. Estatística parcimônia foi usada para reconstruir a relação filogenética entre os haplótipos usando o programa TCS versão 1.18 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000; SCHNEIDER; STEPHENS, 1999).

O software Baps (Análise Bayesiana de Estruturação Populacional) (CORANDER; MARTTINEN, 2006; SLATKIN, 1993; SLATKIN; HUDSON, 1999) foi empregado para verificar a relação genética entre as populações, agrupando aqueles que são semelhantes

geneticamente. Agrupamentos foram testados em cinco repetições para cada valor de K, até K = 10. O melhor K foi avaliado de acordo com os escores likelihood.

O teste Mantel (1967) foi gerado no programa Arlequin, de forma a verificar se há correlação entre as matrizes de valores FST par-a-par e dos valores de log de base 10 das distâncias geográficas entre os pares de população com 10.000 permutações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da variação do DNA cloroplastídico

O tamanho do fragmento amplificado na região *psbB-psbF* foi de 762 pb, onde 12 sítios se mostraram polimórficos, sendo 9 singletons e 3 parsimônia informativa. Quatro haplótipos foram detectados após sequenciar todos os 123 indivíduos (Tabela 3). Foi observado que o espaçador intergênico *psbB-psbF* mostrou a maioria dos sítios variáveis na região 5'. A maior parte da variação, 75% dos sítios polimórficos, se encontra nas primeiras 300 bases (Figura 2). O domínio central do fragmento de DNA *psbB-psbF*, cerca de 200 bases, se mostrou altamente conservada entre as duas espécies. Algumas regiões do cpDNA que são amplamente estudadas, tais como o espaçador intergênico *psbB-psbF*, se mostram muito conservadas em espécies afins (BONATELLI et al., 2013), como em *C. macrophyllum* e *C. tocaninum*.

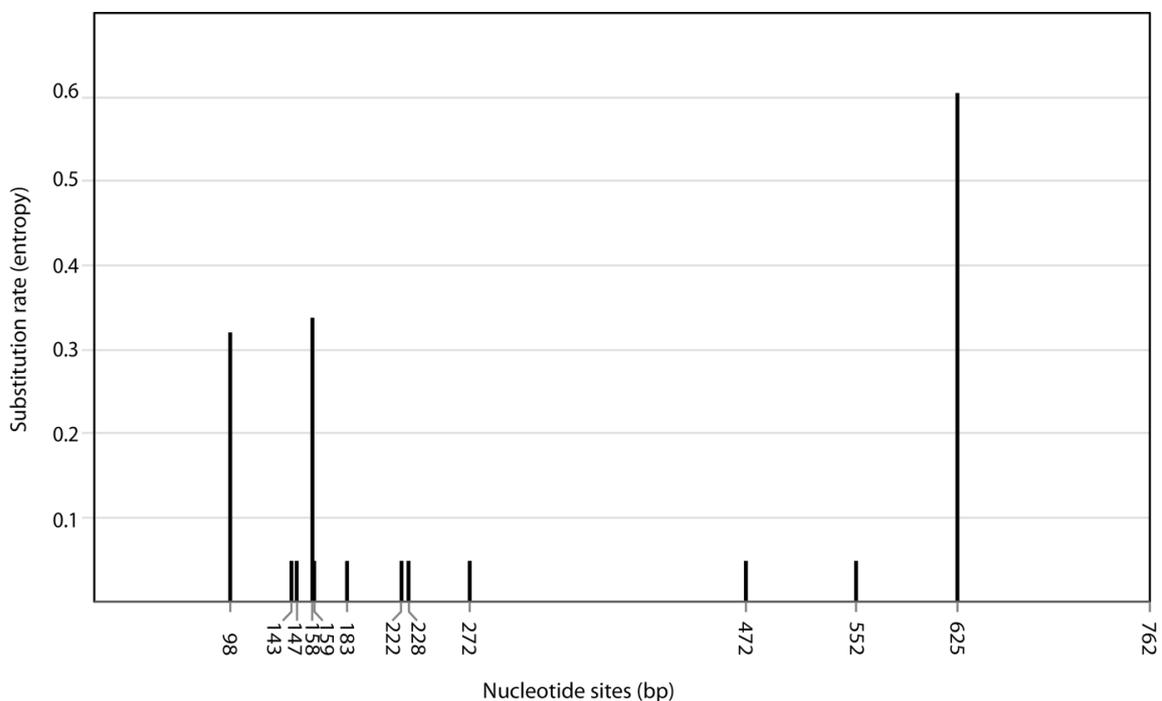


Figura 2 - Distribuição das sequências variáveis (entropia) ao longo do segmento *psbB-psbF* do genoma cloroplastídico de *Cenostigma* sp.

Tabela 3 - Sítios variáveis observados no fragmento *psbB-psbF* de 762 pb do *cpDNA*, definindo os quatro haplótipos diferentes, encontrados em *Cenostigma macrophyllum* e *C. tocaninum*. As posições dos nucleotídeos foram numeradas arbitrariamente.

Haplótipos	n	Posição dos nucleotídeos polimórficos no segmento <i>psbB-psbF</i>											
		98	143	147	158	159	183	222	228	272	472	552	625
H1	36	A	G	C	G	A	G	T	T	C	G	G	G
H2	74	A	G	C	G	A	G	T	T	C	G	G	T
H3	1	A	C	T	T	C	T	C	G	A	T	A	T
H4	12	G	G	C	T	A	G	T	T	C	G	G	T

A relação transição/transversão foi de 1,68, as frequências das bases foram $f_A = 0.3058$, $f_T = 0.3373$, $f_C = 0.1719$, e $f_G = 0.1827$. A composição de bases do fragmento estudado foi de 64% AT, e estável entre os indivíduos. Embora os genomas plastídias sejam, geralmente, ricos em AT (HOWE et al., 2003), o que facilita a formação de DNA de estrutura secundária e a ocorrência de indels, a região estudada não apresentou a ocorrência de indels nessas espécies. Um perfil similar de composição de bases do espaçador intergênico *psbB-psbF* foi observado em outra espécie arbórea, *Ceiba pentandra* ($f_A = 0.30$, $f_T = 0.34$, $f_C = 0.17$, $f_G = 0.19$) (DICK et al., 2007).

A análise de saturação de substituição está ilustrada na Figura 3. Ambas, transições e transversões estão correlacionadas com as distâncias genéticas, e pelo menos 82,5% da variação nas transições e 95,3% da variação nas transversões podem ser explicadas por uma regressão linear. Os resultados da análise de saturação de substituição apresentou ISS (0,0102) significativamente mais baixo ($P = 0,0000$) do que o seu valor crítico ISS ($ISS.c = 0,8104$), indicando que as sequências mostram pouca saturação e, portanto, são úteis na reconstrução filogenética (XIA et al., 2003; XIA; LEMEY, 2009).

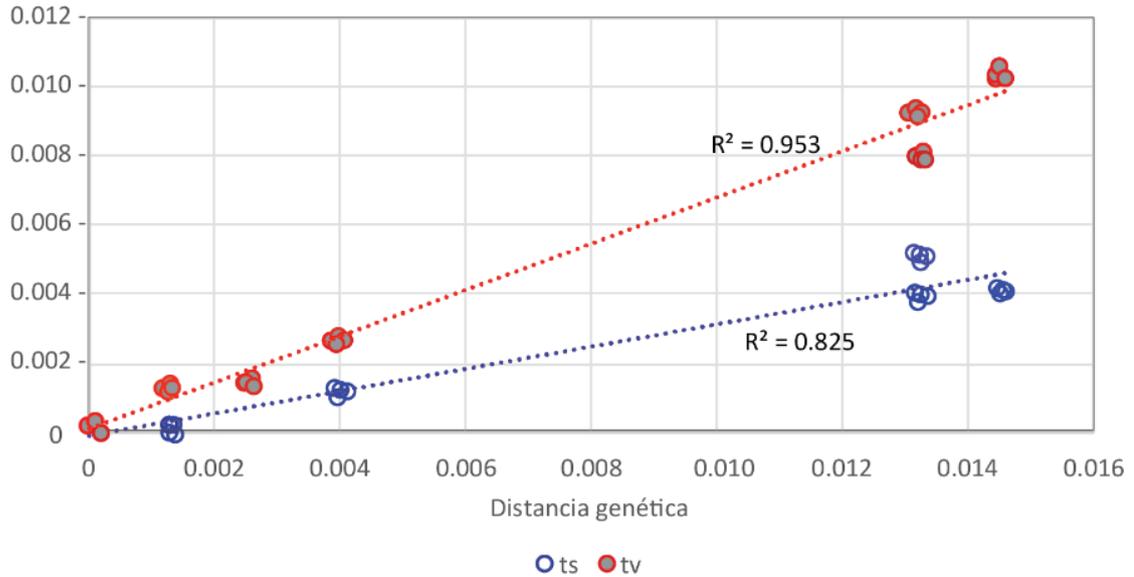


Figura 3 - Índice de saturação para o segmento cloroplastídico *psbB-psbF* em *Cenostigma sp.* A proporção observada de transição (ts) e transversão (tv) destas sequências foram plotadas de acordo com a distância genética de Tamura 3-parameter.

O índice de diversidade genética (media \pm desvio padrão), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π) são apresentados na Tabela 4. A diversidade haplotípica e a diversidade nucleotídica foram 0,547 (0034) e 0,001228 (0,000933), respectivamente. Entretanto, os níveis imparciais de diversidade intrapopulacional variaram substancialmente, passando de Hd = 0,303 (THE-Cca), 0,182 (BAR-Pi), 0,182 (THE-Pc) para Hd = 0,0 para todos os outros locais de coleta.

Tabela 4. Locais de coleta, tamanho da amostra (N) e resumo estatístico da variabilidade genética para as populações de *Cenostigma macrophyllum* e *C. tocaninum*.

Localidade	Código	n	Nh	Np	Tv/Ts	M	Hd±SD	π±SD
Altos	ALT-Pi	9	1	0	2,790	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Codó	COD-Ma	10	1	0	3,510	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Floriano	FLO-Pi	12	1	0	3,000	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Miguel Leão	MIL-Pi	11	1	0	2,900	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Santana do Piauí	SAP-Pi	7	1	0	2,000	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Barretinho	BAR-Pi	11	2	10	0,430	0,242	0,182±0,144	0,0024±0,0018
Serra da Capivara	SEC-Pi	12	1	0	0,460	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Teresina_CCA	THE_Cca	12	2	1	0,000	9,000	0,303±0,147	0,0004±0,0002
Teresina_PC	THE_Pc	11	1	1	0,000	0,000	0,182±0,144	0,0002±0,0002
Teresina_Zoo	THE-Zoo	12	1	0	0,460	9,138	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Timon	TIM-Ma	4	1	0	1,010	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
Manaus	MAN-Am	12	1	0	3,620	0,000	0,000±0,000	0,0000±0,0000
TOTAL		123	4	12	1,680	1,53170	0,547±0,034	0,0012±0,0009

n: número de indivíduos sequenciados; Nh: número de haplótipos; Np: número de sítios polimórficos; Tv/Ts: Taxa de transverso/transição; M: média do número de diferença entre pares; Hd: diversidade haplotípica; π: diversidade nucleotídica; SD: desvio padrão.

Análises Filogenéticas e de Rede

Para o segmento *psbB-psbF*, utilizando os 123 indivíduos sequenciados, o modelo evolutivo mais adequado foi selecionado com base no menor score do Critério de Informação Bayesiana (BIC), que levou ao modelo de Tamura 3-parameter (t92) (TAMURA et al., 2013) para a construção da árvore de Neighbour-joining, tendo o menor score de 5023,35. O modelo com menor score do Critério de Informação Bayesiana (BIC) é considerado para descrever o melhor padrão de substituição (SCHWARZ, 1978). Na árvore filogenética, foram observadas três separações distintas, correspondentes às duas espécies investigadas (*C. macrophyllum* e *C. tocaninum*) e uma subdivisão dentro da espécie *C. macrophyllum* (Figura 4).

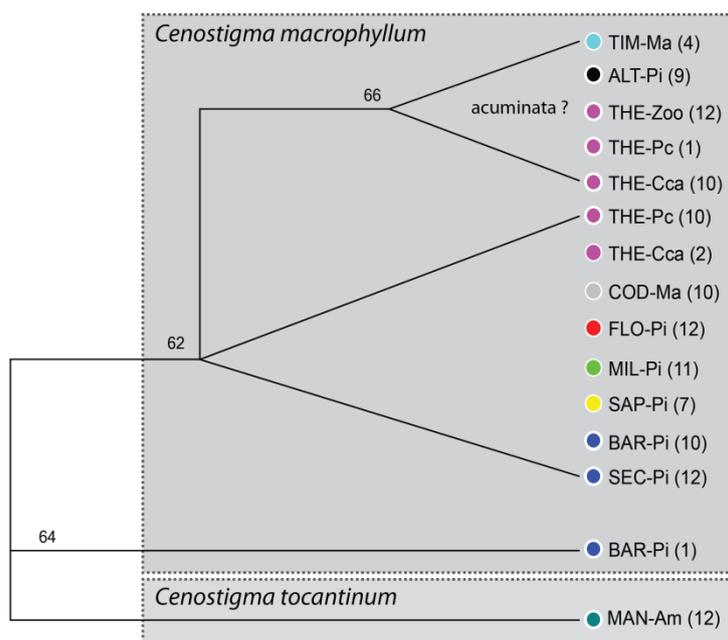


Figura 4. Árvore de *Neighbour-joining* baseada no alinhamento das sequências de *psbB-psbF* de *Cenostigma macrophyllum* e *C. tocaninum*. Os Bootstraps que forneceram valores >50 estão mostrados nos nós.

A rede de haplótipos, como inferido a partir do programa TCS (ver Material e Métodos), mostrou as relações genealógicas entre os quatro haplótipos, com base no número de substituições. Dois desses haplótipos, denominados H1 e H2, foram presentes em maior frequência entre os haplótipos coletados de *Cenostigma sp.* (Tabela 3).

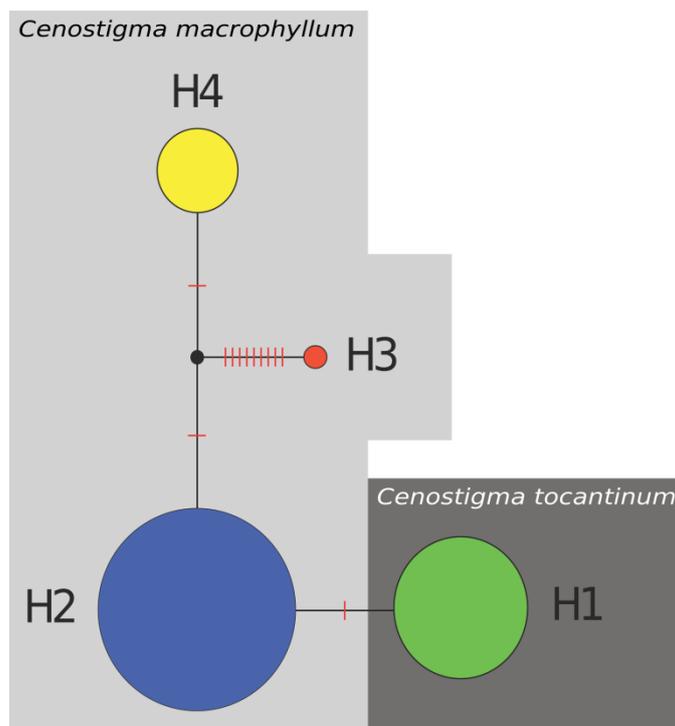


Figure 5. Rede de haplótipos para DNACp *psbB-psbF* estimada com o algoritmo estatístico de parcimônia, com 95% descrito por TEMPLETON, CRANDALL e SING (1992). Os haplótipos são representados por círculos com áreas proporcionais às suas frequências em cada espécie. O ponto preto representa haplótipos ausentes (não incluídos na amostra ou extintos). As cores dos círculos indicam diferentes haplótipos. O número de linhas verticais curtas corresponde ao número de mutações entre dois haplótipos que se distinguem por mais do que uma mutação.

Ambas as análises, filogenética e rede haplotípica, confirmam a distinção entre *C. macrophyllum* e *C. tocantinum* (WARWICK; LEWIS, 2009). Além disso, existem diferenças entre as populações da região sul e norte dos estados do Piauí e Maranhão. Uma variedade diferente de *C. macrophyllum* parece existir em Teresina (THE-Cca e THE-Zoo) e populações próximas (TIM-MA e ALT-PI) como indicado anteriormente *C. macrophyllum* Tul. var. *acuminata* (FREIRE, 1994). Possivelmente, essa diferenciação genética observada entre as populações de caneleiro seja remanescente do período no qual as populações não se apresentavam tão fragmentadas.

Em Teresina, dois haplótipos parecem conviver com pouco fluxo gênico entre eles. Na ausência de barreiras geográficas evidentes, e na presença de zonas de contato simpátricas, uma possível explicação ao reduzido fluxo gênico entre as populações de morfotipos de *C. macrophyllum* Tul. var. *acuminata* seriam limitações à dispersão. A

ecologia da dispersão desta espécie ainda é pouco explorada, sem evidências diretas dos possíveis agentes dispersores.

Análise da Estrutura Populacional

A análise de variância molecular das sequências do *cpDNA* de *Cenostigma* sp., baseada nas frequências de haplótipos, revelou que 21,13 % da variação genética ocorreu dentro das populações de *Cenostigma macrophyllum* e *C. tocaninum*, enquanto que 78,87 % da variação genética ocorreu entre as populações (Tabela 5). O índice médio de fixação (F_{ST} = 0,789; $P = 0,00$) indica existência de estrutura genética nas populações de *C. macrophyllum* e *C. tocaninum*. Quando as populações de *C. macrophyllum* foram observadas separadamente, detectou-se uma variação intraespecífica de 64,64 % entre as populações investigadas. Dentro das populações, a variação genética foi de 35,36%. O valor de F_{ST} para a espécie foi de 0,646 ($P = 0,00$), uma evidência de estruturação genética populacional dentro das onze populações naturais de *Cenostigma macrophyllum* (Tabela 5). No entanto, é necessário cautela, pois o número de locos polimórficos sobre o qual os valores F_{ST} foram baseados é baixo.

Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA) para as 12 populações de *Cenostigma macrophyllum* and *C. tocaninum* com base no segmento *psbB-psbF* do *cpDNA*.

Haplótipos <i>cpDNA</i>	Fonte de variação	d.f.	SS	VC	Porcentagem de variação	Índice de Fixação
Todas as amostras	Entre populações	11	45.17	0.3623	78.87	F_{ST} =0.78873*
	Dentro populações	11	11.66	0.1051		
		1	7	1 Vb	21.13	
		10	22.56	0.2133	64.64	
C. <i>macrophyllum</i>	Entre populações	10	8	2 Va	35.36	F_{ST} =0.64645*
	Dentro populações	11	11.66	0.1166		
		0	7	7 Vb		

Todas as amostras: *C. macrophyllum* e *C. tocaninum*; d.f.: grau de liberdade; SS: soma dos quadrados; VC: components de variancia; F_{ST} , variancia dentro das populações.

De acordo com os valores de F_{ST} e D_a , derivados das frequências dos haplótipos, todas as amostras coletadas a partir das populações THE-Cca, THE-Zoo, TIM-Ma e ALT-Pi

mostraram diferenciação genética estatisticamente significativa quando comparadas às amostras das populações de THE-Pc, SEC-Pi, BAR-Pi, SAP-Pi, MIL-Pi, FLO-Pi, COD-Ma (Tabela 6). Todas as possíveis comparações dos pares de haplótipos (*pairwise*) foram altas entre estes dois grupos. Este padrão de variação é comumente observado em estudos filogeográficos de espécies de plantas que apresentam uma distribuição parcial na região Neotropical, como bromélias, cactos e petúnias (BARBARÁ et al., 2008; HELSEN et al., 2009; LORENZ-LEMKE et al., 2010; PENNINGTON; RATTER; LEWIS, 2006). Provavelmente, a variação intrapopulacional se deve mais ao padrão de distribuição e história demográfica dessas espécies Neotropicais, do que ao próprio marcador molecular. Testes adicionais se fazem necessários com amostragens, genômica e geográfica, mais amplas.

Tabela 6. Média corrigida da diferença *pairwise* D_a (diagonal acima) e F_{ST} (diagonal abaixo) entre as populações com base na sequência *psbB-psbF* do DNA cloroplastídico.

	ALT-Pi	COD-Ma	FLO_Pi	MIL-Pi	SAP-Pi	BAR-Pi	SEC-Pi	THE-Cca	THE-Pc	THE-Zoo	TIM-Ma
ALT-Pi	-	1,00000*	1,00000*	1,00000*	1,00000*	1,00000*	1,00000*	0,01515	0,81818*	0,00000	0,00000
COD-Ma	1,00000*	-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,68182*	0,00000	1,00000*	1,00000*
FLO_Pi	1,00000*	0,00000	-	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,68182*	0,00000	1,00000*	1,00000*
MIL-Pi	1,00000*	0,00000	0,00000	-	0,00000	0,00000	0,00000	0,68182*	0,00000	1,00000*	1,00000*
SAP-Pi	1,00000*	0,00000	0,00000	0,00000	-	0,00000	0,00000	0,68182*	0,00000	1,00000*	1,00000*
BAR-Pi	0,49259*	-0,00917	0,00826	0,00000	-0,04620	-	0,00000	0,68182*	0,00000	1,00000*	1,00000*
SEC-Pi	1,00000*	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00826	-	0,68182*	0,00000	1,00000*	1,00000*
THE-Caa	0,05759	0,80296*	0,81818*	0,81089*	0,77419*	0,40169*	0,81818*	-	0,53030*	0,01515	0,01515
THE-Pc	0,88988*	-0,00917	0,00826	0,00000	-0,04620	0,00000	0,00826	0,68352*	-	0,81818*	0,81818*
THE-Zoo	0,00000	1,00000*	1,00000*	1,00000	1,00000*	0,53775*	1,00000*	0,09091	0,90438*	-	0,00000
TIM-Ma	0,00000	1,00000*	1,00000*	1,00000	1,00000*	0,37642*	1,00000*	-0,05263	0,85160*	0,00000	-

**p*-value of corrected average pairwise differences.

Os coeficientes de diferenciação G_{ST} (0.780) e N_{ST} (0.788) foram significativamente diferentes de zero ($P < 0.01$) (Tabela 7). O teste de permutação mostrou que o N_{ST} foi significativamente maior que o G_{ST} ($P < 0.05$), sugerindo a existência de estruturas filogeográficas. De acordo com Pons e Petit (1996), $N_{ST} > G_{ST}$ indica que haplótipos similares são encontrados juntos na mesma população do com mais frequência do que haplótipos escolhidos aleatoriamente.

Tabela 7. Significado da diversidade genética intrapopulacional (hS, vS), diversidade genética total (hT, vT), e coeficientes de diferenciação (GST, NST) para todas as populações de *Cenostigma macrophyllum*. Os padrões de erros estão indicados entre parenteses.

Alelos	Diversidade genética intrapopulacional	Diversidade genética Total	Coefficientes de diferenciação*
Unordered	hS = 0,117 ± 0,0635	hT = 0,529 ± 0,0765	GST = 0,780 ± 0,016
Ordered	vS = 0,112 ± 0,0581	vT = 0,529 ± 0,0696	NST = 0,788 ± 0,018

* Indica que NST é significativamente diferente de GST ($P < 0.05$).

O teste de Mantel (1967) revelou uma correlação não significativa entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas dos haplótipos do *cpDNA* ($r = 0,1206$, $P = 0,9909$) para todas as populações amostradas. Não havendo isolamento por distância, a hipótese dos gradientes ecológicos (ENDLER, 1977, 1978), que prevê diferenciação gradual entre as populações em função de sua separação espacial, foi descartada.

No programa BAPS foi detectado três frequentes haplogrupos (HG) e um haplótipo distinto destes três grupos (Figura 6). Um destes grupos refere-se à amostras coletadas em Manaus e oriundas da espécie *C. tocantinum*. Os outros dois haplogrupos caracterizam-se por amostras coletadas principalmente em Teresina e em um eixo de aproximadamente 30 km (Altos – PI). Excepcionalmente, indivíduos coletados no Parque da Cidade pertencem a um haplogrupo distinto, com amostras coletadas fora deste eixo de 30 km. Todos os indivíduos foram corretamente atribuídos aos seus respectivos haplogrupos ($P > 0,05$).

Quase nada se sabe sobre a história de manejo dessas espécies dentro dos seus locais de coleta. No entanto, fica claro que a diversidade genética dentro das populações precisa ser ampliada. Intervenções antropogênicas, como o desmatamento para construção de estradas e o crescimento das áreas urbanas, podem ter influenciado de

forma a diminuir a diversidade genética dentro das populações. Os dados de diversidade genética gerados neste estudo, por conseguinte, podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação (DICK et al., 2007).

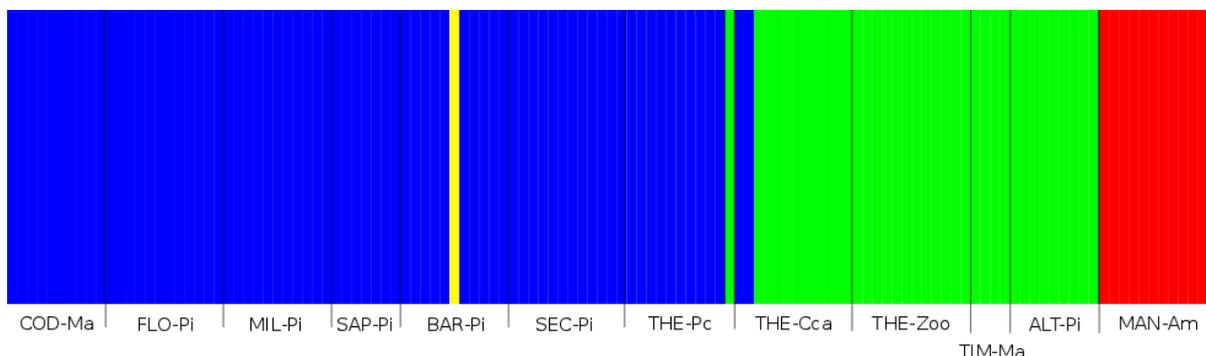


Figura 6 - Análise Bayesiana para as sequências *psbB-psbF* das doze localidades amostradas. Cada barra na vertical representa um indivíduo e está associado à respectiva probabilidade deste pertencer a um dos haplótipos detectados ($p = 1$).

As populações de Teresina (THE-Cca e THE-Pc) e de São Raimundo Nonato (BAR-PI) apresentaram a maior diversidade quanto ao número de sítios polimórficos e haplótipos, sendo as únicas populações a apresentarem mais de um haplótipo para os dados das sequências. Essa mistura de material genético de outro grupo indica que estes indivíduos podem ter origem compartilhada, sendo resultado de um intercâmbio de genes entre as populações analisadas.

O resultado da análise bayesiana de estruturação populacional pode estar refletindo um longo período de existência sem gargalos populacionais significativos destas populações quando comparadas às outras estudadas, o que ocasionou tempo suficiente a estas três populações para acumular mutações, sendo assim provavelmente as populações mais antigas da região Meio-Norte (Piauí e Maranhão).

A presença de um único haplótipo nas outras populações poderia ser explicada pela ação natural, porém sequências não-codificadoras do *cpDNA* apresentam evolução neutra. O mais provável é que essas populações sejam o resultado de uma colonização recente a partir de um único haplótipo fundador (AVISE, 2000). A ausência de substituições nucleotídicas em sequências de DNA, em algumas populações, também indica um curto tempo de divergência nas sequências do genoma de cloroplasto analisadas para *Cenostigma*.

Este estudo demonstrou o potencial da região *psbB-psbF* para contribuir com a elucidação das relações entre espécies estreitamente relacionadas e para realizar estudos de Genética de Populações sobre o gênero *Cenostigma*. Regiões não codificantes do genoma, tais como espaçadores intergênicos são *hot spots* para mutações e proporcionam uma fonte oportuna para a detecção de variações intra e interespecíficas nas sequências de DNA (INTRIERI; MULEO; BUIATTI, 2007), como visto neste estudo.

Adicionalmente, as análises deste estudo suportam a subdivisão de *C. macrophyllum* em duas taxa (var. *acuminata* e uma variedade diferente). Com base nos dados moleculares, a maioria dos acessos coletados em Teresina (PI) e cidades próximas podem pertencer a variedade *acuminata*. Ao sul, no mapa, existe a possibilidade da ocorrência de uma nova variedade. A separação entre essas duas possíveis variedades sugere que a espécie pode estar passando por um processo incipiente de especiação. Esses dados apresentam uma visão sobre a diferenciação populacional em *C. macrophyllum* e sugerem que ambas as forças, históricas e contemporâneas, têm sido importantes na constituição da estruturação genética da espécie. Esta avaliação de diferenciação interespecífica e subestruturação intraespecífica, a nível de DNA, irá fornecer uma base sólida para estudos futuros a respeito dos conceitos de espécie, taxonomia e especiação (WIENS, 2007; QUEIROZ, 2011; HAUSDORF, 2011).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder bolsa de estudo para o primeiro autor.

REFERÊNCIAS

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, London, 2000.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BARBARÁ, T.; LEXER, C.; MARTINELLI, G.; MAYO, S. Within-population spatial genetic structure in four naturally fragmented species of a neotropical inselberg radiation, *Alcantarea imperialis*, *A. geniculata*, *A. glaziouana* and *A. regina* (Bromeliaceae). **Heredity**, v. 101, p. 285-296, 2008.

BONATELLI, I. A. S.; ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. P.; MORAES, E. M. Usefulness of *cpDNA* markers for phylogenetic and phylogeographic analyses of closely related cactus species. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 4579–4585, 2013.

CLEMENT, M. D.; POSADA, M. D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657–1660, 2000.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P. Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 2833–2843, 2006.

DICK, C. W., BERMINGHAM, E., LEMES, M. R., E GRIBEL, R. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3039-3049, 2007.

ENDER, J. A. **Geographic Variation, Speciation and Clines**. Princeton University Press, Princeton, 1977.

ENDER, J. A.. A predator's view of animal color patterns. **Evolutionary Biology**, v. 11, p. 319-364, 1978.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479–491, 1992.

FREIRE, F. M. T. **Revisão taxonômica do gênero *Cenostigma* Tul. (Leguminosae-Caesalpinioideae) para o Brasil**. 1994, 113f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1994.

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

FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915–925, 1997.

FUJII, N.; UEDA, K.; WATANO, Y.; SHIMIZU, T. Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* Steven (Scrophulariaceae) and geographic structuring of the Japanese “alpine” plants. **Journal of Plant Research**, v. 110, p. 195–207, 1997.

HALL, T. A., BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMILTON, M. B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 521–523, 1999.

HAUSDORF, B. Progress toward a general species concept. **Evolution**, v. 65, p. 923–993, 2011.

HELSEN, P.; BROWNE, R. A.; ANDERSON, D. J.; VERDYCK, P. Galápagos’ *Opuntia* (prickly pear) cacti: extensive morphological diversity, low genetic variability. **Biological Journal Linnean Society**, v. 96, p. 451–461, 2009.

HONJO, M.; UENO, S.; TSUMURA, T.; WASHITANI, I.; OHSAWA, R. Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. **Biological Conservation**, v. 120, p. 211–220, 2004.

HOWE, C. J., A. C. BARBROOK, V. L. KOUMANDOU, R. E. R. NISBET, H. A. SYMINGTON, AND T. F. WIGHTMAN. Evolution of the chloroplast genome. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 358, p. 99–107, 2003.

INTRIERI, M. C.; MULEO, R.; BUIATTI, M. Chloroplast DNA polymorphisms as molecular markers to identify cultivars of *Olea europaea* L. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 82, p. 109–113, 2007.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p. 707–713, 2005.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451–1452, 2009.

- LORENZ-LEMKE, A. P.; MUSCHNER, V. C.; BONATTO, S. L.; CERVI, A. C.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. **Annals of Botany**, v. 95, p. 799–806, 2005.
- LORENZ-LEMKE, A. P.; TOGNI, P. D.; MADER, G.; KRIEDT, R. A. Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). **Molecular Ecology**, v. 19, p. 5240-5251, 2010.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209–220, 1967.
- MILLER, A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **PNAS**, v. 102, p. 12801-12806, 2005.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.
- NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology e Evolution**, v. 14, p. 140–145, 1999.
- PENNINGTON, R. T.; RATTER, J. A.; LEWIS, G. P. Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography, and conservation. Boca RatonFL: CRC/Taylor & Francis. 484 p. 2006.
- PONS, O; PETIT, R. J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. **Genetics**, v. 144, p. 1237–1245, 1996.
- QUEIROZ, K. Branches in the lines of descent: Charles Darwin and the evolution of the species concept. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, p. 19–35, 2011.
- ROGERS, A.J.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 552–569, 1992.
- SCHAAL, B. A.; HAYWORTH, D. A.; OLSEN, K. M.; RAUSCHER, J. T.; SMITH, W. A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 465–474, 1998.
- SCHNEIDER, T. D.; STEPHENS R. M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6097–6100, 1999.
- SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **Annals Statistic**, v. 6, p. 461-464, 1978.

- SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. **Evolution**, v. 47, p. 264–279, 1993.
- SLATKIN, M.; HUDSON, R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129 p. 555–562, 1999.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G.M.; AYRESM.C.C.; COSTA, C.L.S.d.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.d.M.; BRANDÃO, M.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–595, 1989.
- TAMURA, K.; STECHER, G. PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 678–687, 1992.
- TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, p. 619–633, 1992.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876–4882, 1997.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. A revision of *Cenostigma* (Leguminosae – Caesalpinioideae – Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil. **Kew Bulletin**, v. 64, p. 135–146, 2009.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.
- WERNECK, F. P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews**, v. 30, p. 1630–1648, 2011.

WIENS, J. J. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology**, v. 56, p. 875–878, 2007.

XIA, X.; LEMEY, P. Assessing substitution saturation with DAMBE. Pp. 615-630 in PHILIPPE LEMEY, MARCO SALEMI AND ANNE-MIEKE VANDAMME, eds. **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny**. 2nd edition Cambridge University Press. 2009.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 371–373, 2001.

XIA, X.; XIE, Z.; SALEME, M.; CHEN, L.; WANG, Y. An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 26, p. 1–7, 2003.