



FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

Obtenção de sequência de DNA barcode para estudos de filogenia do gênero *Annona*

Orientador

Doriane Picanço Rodrigues

Aluno

Thamiles das Chagas Gonçalves

2. Informações de Acesso ao Documento

2.1 Este documento é confidencial?

SIM

NÃO

2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM

NÃO

2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM

NÃO

**2.4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados?
Especifique.**

3. Introdução

O gênero *Annona* é um dos gêneros mais representativos na flora brasileira, compreendido em uma das maiores famílias de angiospermas, a família Annonaceae (Lopes & Mello-Silva 2014). Recentemente, este foi redefinido e cerca de 40 espécies do extinto gênero *Rollinia* foram realocadas como pertencentes ao gênero *Annona* (figura 1) (Rainer 2007), porém, trabalhos ainda não publicados realizados no Laboratório de Evolução Aplicada, apontam para um possível erro nesta reclassificação.

Esta reclassificação se deu através de um estudo utilizando sequências de genes nucleares e de cloroplasto, pois suas evoluções se dão de forma distinta (figura 1). Os

genes nucleares utilizados foram dois microssatélites que amplificam sequências de 170-270 pb e 6-12 repetições de GA/CT (Escribano *et al.* 2004). Já o gene de cloroplasto foi o *rbcL* que é altamente conservado, pois codifica a enzima envolvida no metabolismo de carbono durante a fotossíntese (Ritland & Clegg 1987).

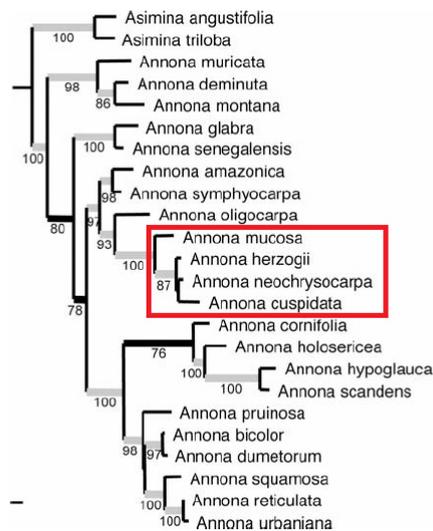


Figura 1. Reclassificação de algumas Rollinia em Annona baseada em *rbcL*, *trnLF*, LMCH9 e LMCH10 combinados por Chatrou et al 2009. Em vermelho o grupo das ex-Rollinia.

O rápido avanço nas técnicas de sequenciamento de DNA proporcionou a uma ótima ferramenta para estudos de evolução e filogenia. Sequências específicas de DNA utilizadas para identificar espécies são conhecidas como DNA barcode (Hebert et al. 2003). Essas sequências são obtidas com o uso de marcadores moleculares. Com a criação do CBOL (Consortium for Barcode of Life) foi definido que as regiões *rbcL* + *matK* (marcadores de cloroplastos) são as padrões para o barcode de plantas (Azevedo et al. 2012).

Esses marcadores de cloroplastos foram escolhidos, pois têm sido uma importante fonte de dados para o estudo da filogenia de plantas. Algumas vantagens das suas aplicações são sua abundância relativa no DNA das plantas e as suas taxas de mutação relativamente conservadas, facilitando a amplificação, pois os primers se ligam a regiões conservadas (Chatrou et al. 2009).

O projeto BrBOL (Brazilian Barcode of Life) objetiva integrar as diversas coleções de DNA barcode em um banco de dados de acesso livre (Azevedo et al. 2012). Esta



integração de dados ampliaria a escala de identificação e conhecimento da biodiversidade.

Além desse banco, muitos outros de sequências de DNA foram criados visando propiciar estudos genéticos para as mais distintas finalidades (Santos *et al.* 2002). O GenBank, criado no Centro Norte Americano para Informação Biotecnológica (NCBI, na sigla em inglês) foi um dos primeiros bancos de dados de consulta pública a ser criado para depósito de sequências de DNA e atualmente é um dos mais utilizados (Prosdocimi & Santos 2004).

A implantação e a manutenção de coleções de sequências de DNA nesses bancos visam promover inicialmente o conhecimento dos genomas das espécies que se queira estudar, além disso, propicia estratégias de preservação e/ou de manejo de animais adequadas de acordo com critérios de genética populacional, auxilia projetos de procriação em cativeiro, permite o planejamento de preservação dos biomas e conservação da biodiversidade e principalmente possibilita uma melhor compreensão da filogenia das espécies e interação destas na natureza (Santos *et al.* 2002).

Porém, apesar da família Annonaceae ser uma das maiores de angiosperma é uma das menos estudadas entre as famílias de plantas tropicais (Ribeiro *et al.* 2013) e suas informações em banco de dados são escassas. A necessidade de conhecer um maior número de dados e informações sobre as espécies, na tentativa de resolver dados conflitantes sobre suas origens, torna imprescindível o uso de banco de dados para o conhecimento básico do conteúdo de DNA das espécies (Soares *et al.* 2014).

Desse modo, é possível perceber a importância de se ter sequências de DNA dos mais variados organismos em bancos de dados. A proposta atual visa obter sequências de dois genes de cloroplasto, já propostos como padrões de DNA barcode, de espécies do gênero *Annona* e adicioná-las a bancos de dados a fim de enriquecê-los. Assim será possível selecionar sequências que possam discriminar espécies, o que irá auxiliar no estudo da filogenia do gênero.

4. Justificativa

O gênero *Rollinia* era pertencente à família Annonaceae e possuía 44 espécies, que recentemente, foram reclassificadas como pertencentes ao gênero monofilético *Annona* (Rainer 2007), um dos mais diversos e que dá o nome à família (Chatrou *et al.* 2009).



Dentre essas espécies está a *Annona mucosa* Jacq. (*Rollinia mucosa* (Jacquin) Baillon), uma fruteira amazônica conhecida como biribazeiro, cujas populações atuais são completamente domesticadas, de modo que dependem inteiramente da ação humana para seu estabelecimento e propagação (Clement 1999). Fruteiras tropicais como esta normalmente sofreram seleção humana buscando-se frutificação ao longo do ano, melhor sabor e tamanho dos frutos (Clement 2001).

Outras duas espécies um pouco menos conhecidas também sofreram reclassificação, a *Annona cuspidata* e *Annona edulis*, cujo registro de cultivo data de tempos pré-colombianos (Patiño 2002). Essas três espécies de ex-Rollinia apresentam um envelope climático muito similar, restrito à Amazônia no Peru e Equador (Kumagai dados não publicados). Porém *A. mucosa* ocorre amplamente por toda Amazônia brasileira, fato este que nos leva a acreditar que os cuidados humanos permitem essa plasticidade climática.

Ao se estudar planta cultivada é de extrema importância buscar o parente silvestre e a região de origem deste cultivo (Clement, 2001). Existem outras duas espécies de ex-Rollinia cujos frutos se assemelham muito aos da *A. mucosa*, são eles *Annona exsucca* e *Annona neoinsignis*, porém não há comprovação científica de que sejam parentes silvestres do biribazeiro.

Com a informação molecular desses possíveis parentes silvestres e das espécies que possivelmente sofreram pressão de cultivo semelhante seria possível analisar a filogenia do gênero *Annona*. Porém a falta de sequências de DNA barcode das espécies pertencentes a esta família em banco de dados dificulta esta análise.

Deste modo torna-se necessário obter sequências de cpDNA para que seja possível o estudo da atual filogenia do gênero *Annona* e acrescentar esses dados genéticos em banco de dados, visando auxiliar futuros estudos genéticos.

5. Objetivos

Obtenção de sequências de cpDNA para estudo da filogenia do ex-grupo *Rollinia*, que é atualmente considerado pertencente ao gênero *Annona*, visando adicioná-las a bancos de dados e assim contribuir com informação genéticas para o gênero.

5.1 Objetivos específicos

1. Gerar sequências de duas regiões cpDNA de sete espécies de *Annona*: *A. mucosa*,



UFAM

A. exsucca, A. insignis; A. cuspidata; A. edulis; A. muricata; A. reticulata.

2. Analisar as relações filogenéticas do ex-grupo Rollinia, que é atualmente considerado pertencente ao gênero Annona.
3. Inserir as sequências obtidas no Banco de Dados de sequências.

6. Metodologia

6.1 Material utilizado

A amostragem corresponde a indivíduos de sete espécies de Annona: *A. mucosa*, *A. exsucca*, *A. insignis*; *A. cuspidata*; *A. edulis*; *A. muricata*; *A. reticulata*. Três dessas espécies (*A. insignis*, *A. mucosa* e *A. muricata*) se encontravam no Laboratório de Evolução Aplicada, da Universidade Federal do Amazonas, Campus Manaus, coletado entre 2013 e 2015 em diversas comunidades ribeirinhas ao longo dos principais rios da Amazônia. Estas estavam acondicionadas em sacos de plásticos com sílica gel em freezer a -20 °C. O restante das espécies foi retirado do herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), com exceção de *A. reticulata* que não possuía amostras em Manaus.

6.2 Extração do DNA e quantificação

O DNA genômico total das amostras que se encontravam armazenadas no laboratório foi extraído a partir das folhas usando o método CTAB, com modificações: preparou-se CTAB 5% e deixou-o pré-aquecendo a 60 °C, em seguida adicionou-se 2% de β -mercaptoetanol ao volume total de CTAB. Cortou-se 50 mg de tecido foliar e adicionou em tubos criogênicos junto com beads para que fosse feita a maceração. Retiraram-se as beads e o pó restante foi transferido para tubos de 2 mL.

Adicionou-se 1,2 mL de CTAB, 8 μ L de proteinase K (10 mg/mL) e 3 μ L de RNase (10 mg/ μ L), deu-se um mix de 10 segundos, e colocou os tubos em banho-maria a 50°C por 3 horas, invertendo gentilmente a cada 20 minutos. Passado esse tempo, adicionou-se 500 μ L de CIA (Clorofórmio + Álcool Isoamílico na proporção 24:1), misturou-se suavemente por 5 minutos e centrifugou-se a 10000 rpm por 4 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para tubos de 2 mL e repetiu-se a lavagem com CIA. O sobrenadante retirado nessa lavagem foi transferido para tubos de 1,5 mL, adicionou-se 510 μ L de isopropanol e 30 μ L de acetato de sódio e colocou-se em freezer por 1 dia para precipitação. Passado esse tempo, centrifugou-se por 20 minutos a 13000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 70% para lavagem do pellet,



centrifugando em seguida a 13000 rpm por 1 minuto e descartando o sobrenadante. Repetiu-se essa lavagem utilizando etanol absoluto. Esperou que os pellets secassem por aproximadamente 1 hora e ressuspendeu-os em 50 μ L de TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0), colocando-os em banho-maria a 65°C.

Para as amostras retiradas de herbário foi feito o teste utilizando o protocolo descrito acima, pois este já foi utilizado para extração de amostras de herbário, porém por fim foi utilizado o protocolo Doyle & Doyle (1987) modificado para adição de acetato de sódio. Este consistiu em adicionar 2 % de PVP (polivinilpirrolidona) ao CTAB 5 % deixar em banho-maria a 65 °C até que fosse completamente dissolvido. 50 mg de tecido foliar foi cortado e adicionado em tubos criogênicos junto com beads para maceração, em seguida adicionou-se em cada tubo 800 μ L do CTAB anteriormente preparado, 20 μ L de 2-mercaptotanol, 2 μ L de proteinase K (20 mg/mL) e incubou-os a 55 °C por 30 minutos, misturando a cada 10 minutos. Adicionou-se 600 μ L de CIA (clorofórmio + álcool isoamílico 24:1), homogeneizou por 10 minutos e centrifugou a 12000 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para tubo de 1,5 mL e repetiu-se a lavagem com CIA. Adicionou-se 400 μ L de isopropanol gelado e 60 μ L de acetato de sódio e deixou a -20 °C por 5 minutos. Passado esse tempo, centrifugou a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, lavou os pellets com 1 mL de álcool 70 % deixou que os mesmos secassem a temperatura ambiente e por fim, dissolveu-os em 50 μ L de TE e 2 μ L de RNase (10 mg/mL).

A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8 % (p/v), corado com Brometo de Etídio, por comparações visuais de sua fluorescência com aquelas de padrões de massa molecular conhecida de DNA do fago lambda. As amostras de herbário também foram quantificadas com NanoDrop.

Foram feitas diluições das amostras de DNA extraídos para solução de trabalho com concentração de 5 ng/ μ L.

6.3 Amplificação do DNA

O DNA obtido foi amplificado utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os primers matK e rbcL (Tabela 1) de regiões gênicas de cloroplastos, recomendados para *barcoding* pelo Consortium for Barcoding of Life (CBOL).

Tabela 1. Características dos 2 primers de cloroplastos selecionados e seus respectivos autores. Ta = temperatura de anelamento; pb= par de base.

Primer	Sequência	Ta (°C)	Tamanho (pb)	Autores
matK_3F	CGTACAGTACTTTTTGTGTTTACGAG	52	850	Ki-Joong Kim
matK_1R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC			
rbcLa_R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	55	550	David Erickson
rbcLa_F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC			

Reações de PCR foram otimizadas quanto aos reagentes para obtenção de produtos de amplificação em quantidades suficientes para as próximas etapas. Testou-se o kit de reagentes PCR GoTaq Master Mix Promega, em que o MIX já vem pronto, precisando apenas de primer e DNA. Assim fez-se uma reação de 20 µL total, adicionando 17 µL do MIX, 1 µL de cada primer (forward e reverse - 10 µM cada) e 1 µL de DNA (5 ng/µL). Testaram-se também reações com enzima KAPA (KAPA BIOSYSTEMS), utilizando um volume total de 20 µl, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Quantidade dos reagentes de acordo com as regiões a serem amplificadas.

Reagentes	matK		rbcL	
	Volume	Concentração final	Volume	Concentração final
Água	8,64 µL	-	1,2 µL	-
Tampão 10X	2 µL	1X	2 µL	1X
MgCl ₂ (25 mM)	0,16 µL	1,5 mM	1 µL	1,25 mM
dNTPs (2,5 mM)	1,6 µL	0,2 mM	1,6 µL	0,2 mM
BSA (2,5 mg/mL)	0,8 µL	0,1 mg/mL	-	-
DMSO	1,6 µL	-	-	-
Primer Forward (10 µM)	1,5 µL	1 µM	1 µL	0,5 µM
Primer Reverse (10 µM)	1,5 µL	1 µM	1 µL	0,5 µM
Taq polymerase (5 U/µL)	0,4 µL	2 U/µL	0,2 µL	1 U/µL
DNA (5 ng/µL)	2 µL	10 ng/µL	2 µL	10 ng/µL



Também foram realizados testes das condições de amplificação das regiões do cpDNA via PCR através de gradiente de temperatura, onde as reações são as mesmas, variando-se somente a temperatura na etapa de anelamento dos *primers*.

As amplificações foram realizadas em termociclador (MJ Research PTC-100) seguindo o programa, para *matK*: 94 °C por 1 minuto; trinta e cinco ciclos de 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 72 °C por 50 segundos; e 75 °C por 5 minutos. E para *rbcL*: 95 °C por 4 minutos; trinta e cinco ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2%, numa voltagem de 80 Volts. Após os fragmentos terem sido separados, os produtos foram corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador. O resultado foi avaliado de acordo com a presença ou ausência de banda. Quando houve detecção de banda com baixa resolução, foram realizados testes para otimização das reações com variações na concentração do DNA e primer.

6.4 Sequenciamento

Após a obtenção dos produtos referentes às duas regiões do cpDNA, foi realizado o sequenciamento em sequenciador automático por eletroforese capilar ABI 3130, utilizando o kit ABI BigDye Terminator V.3.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA).

A reação de sequenciamento foi iniciada realizando a purificação do produto por tratamento enzimático com ExoSap (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), adicionando 5,1 µL deste em 17 µL do produto da PCR, sendo esta mistura levada ao termociclador, com o programa: 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos. Em seguida foi feita a reação de sequenciamento, adicionando-se 3,7 µL de água ultrapura, 2 µL de tampão de sequenciamento, 2 µL de primer forward ou reverse (2,5 mM/µL), 0,3 µL de BigDye e 2 µL de produto da PCR purificado. Esta reação seguiu para o termociclador com o programa: 80 °C por 5 minutos, trinta ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Por fim, foi feita a reação de precipitação utilizando o protocolo com NG, onde adicionou-se 6 µL de NG, 45 µL de etanol 100%, incubou as amostras a -20 °C por 30 minutos, centrifugou-se a 4 °C, 4600 rpm por 45 minutos, centrifugou-se novamente, porém com a placa invertida, por 30 segundos a 200 rcf, adicionou-se 110 µL de etanol 70%, centrifugou-se por 15 minutos a 4600 rpm a 4 °C e centrifugou-se novamente com a



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



placa invertida por 30 segundos a 200 rcf, repetiu-se a lavagem com etanol 70 %, deixou a placa secar por 5 minutos e adicionou-se 10 μ L de formamida HiDi, e em seguida, levou-a para o sequenciador.

As sequências foram analisadas através do eletroferograma com o programa Bioedit v.7.2.5. As sequências consenso, que são a sobreposição das duas sequências de DNA (forward e reverse), foram montadas utilizando-se o programa Sequencher v.4.1 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA) e o alinhamento foi feito utilizando-se o programa AliView v.1.18. Os alinhamentos resultantes foram corrigidos manualmente e enviados para submissão no banco de dados GenBank através do programa Sequin v.5.51.

Para a montagem do alinhamento foram adicionadas sequências retiradas do banco de dados Genbank (tabela 3) que possuem grau de parentesco com *Annona*, de acordo com Chatrou 2012.

Tabela 3. Identificação das sequências retiradas do GenBank para grupo externo.

	Espécie	Código GenBank	Voucher
matK	<i>Neostenanthera myristicifolia</i>	AY743486.1	Wieringa, J.J. 3566 (WAG)
	<i>Goniothalamus griffithii</i>	EU715072.1	Nakkuntod, M. 63 (BCU)
	<i>Goniothalamus tapis</i>	DQ125058.1	Kessler, P.J.A. 3193 (L)
	<i>Disepalum pulchrum</i>	GQ139736.1	R. Chan 192 (FLAS)
	<i>Disepalum platypetalum</i>	DQ125057.1	Takeuchi & Sambas 18201
	<i>Asimina obovata</i>	GQ139735.1	Takeuchi & Sambas 18201
	<i>Asimina incana</i>	GQ139734.1	J. R. Abbott 14200 (WU)
	<i>Annona sclerophylla</i>	GQ139718.1	J. R. Abbott 18970 (FLAS)
	<i>Annona glabra</i>	GQ139717.1	J. R. Abbott 17655 (FLAS)
	<i>Annona dumetorum</i>	GQ139704.1	J. R. Abbott 20966 (FLAS)
	<i>Annona prevostiae</i>	JQ626342.1	3312
	<i>Annona montana</i>	KJ012463.1	0118737137
	<i>Annona squamosa</i>	EU715064.1	Nakkuntod, M. 45 (BCU)
rbcL	<i>Neostenanthera myristicifolia</i>	AY743448.1	Wieringa, J.J. 3566 (WAG)
	<i>Goniothalamus griffithii</i>	KM818798.1	Saunders, R. M. K. & Chalermglin, P.04/30 (HKU)
	<i>Goniothalamus tapis</i>	AY841622.1	Kessler, P.J.A. 3193 (L)
	<i>Disepalum pulchrum</i>	JQ513888.1	Y.C. Chan RC192 (FLAS)
	<i>Asimina obovata</i>	KJ773292.1	Abbott 14792 (FLAS)
	<i>Asimina incana</i>	KJ773291.1	Abbott 14200 (FLAS)
	<i>Annona glabra</i>	AY841596.1	Chatrou, L.W. 467 (U)

Annona dumetorum	EU420856.1	U Maas, P.J.M. 8374
Annona prevostiae	JQ625732.1	A110112
Annona Montana	EU420860.1	U Chatrou, L.W. 484
Annona squamosal	EU420865.1	U van Proosdij, A.S.J. 1133

6.5 Análise filogenética

A análise de Inferência Bayesiana (IB, Rannala e Yang 1996; Yang e Rannala 1997) foi realizada no programa BEAST v.1.8.2 (Held e Drummond 2010; Drummond et al. 2012). O modelo de substituição nucleotídica escolhido foi o HKY + G com base no Critério de Informação Akaike (AIC; Akaike 1974) implementado no programa JModelTest (Posada 2008). As cadeias de Monte Carlo Markov (MCMC) foram executadas uma vez por 5.000.000 de gerações registrando os parâmetros de árvore a cada 2.500 gerações. Os resultados foram verificados no programa Tracer v.1.6 (Rambaut e Drummond 2007).

7. Resultados e Discussão

O teste de extração dos indivíduos utilizando o método CTAB obteve grande quantidade de DNA, sendo que dos 50 mg de tecido foliar obtiveram-se de 50 a 200 ng/ μ L (figura 2). Estas foram diluídas a 5 ng/ μ L, conforme mostra a figura 2.

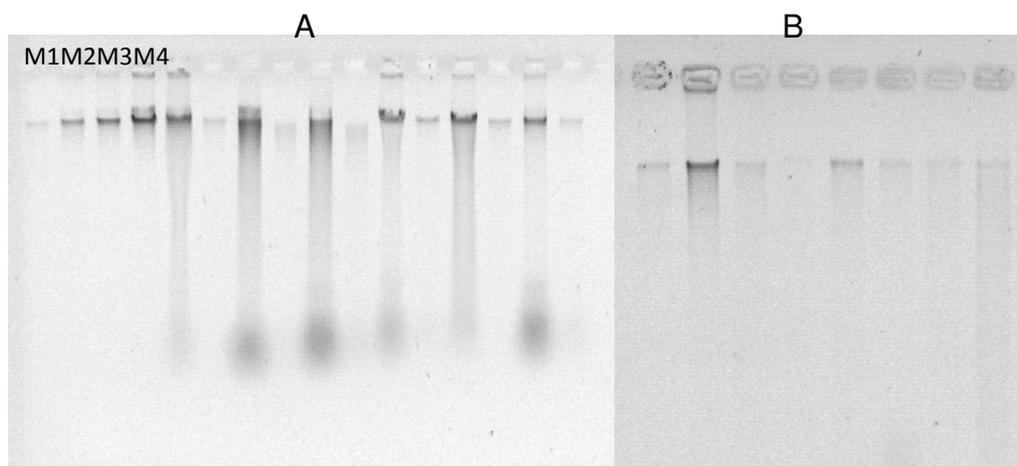


Figura 2. Visualização em gel de agarose do DNA extraído pelo método CTAB. A = Extração total e diluição 1:10. B = DNA diluído a 5 ng/ μ L. M1 = Marcador λ 10 = 10 ng/ μ L; M2 = Marcador λ 20 = 20 ng/ μ L; M3 = Marcador λ 50 = 50 ng/ μ L; M4 = Marcador λ 100 = 100 ng/mL.

A extração do material de herbário obteve baixa qualidade de DNA, visto que esse tipo de amostra passa por processos que podem degradar grande parte do seu material genético, além disso, poucos protocolos são realmente eficientes. No teste feito com o protocolo CTAB 5 % não foi possível obter DNA (figura 3a) e no teste com o protocolo Doyle e Doyle (1987) é possível ver rastros que podem indicar degradação ou contaminação (figura 3b), por isso foi feita uma análise através do NanoDrop, para determinar a quantidade de DNA e o nível de contaminação por proteínas, e o resultado encontra-se na tabela 4.

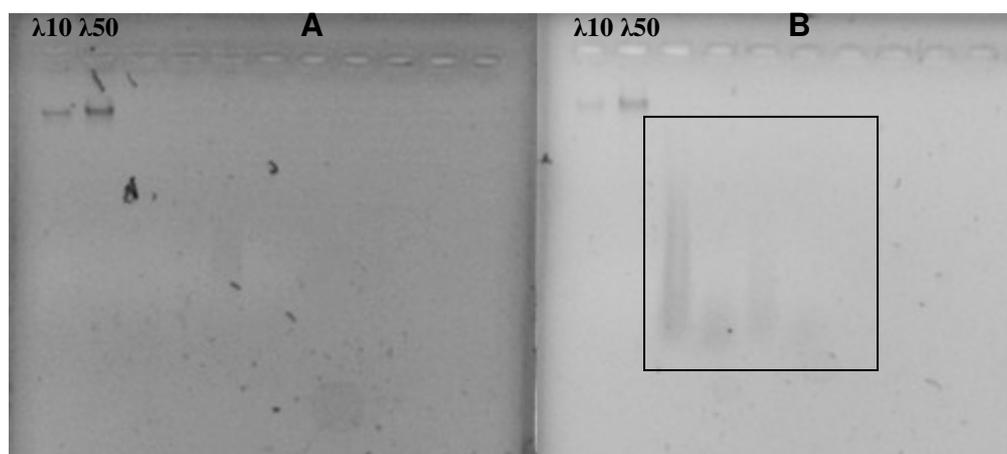


Figura 3. Testes de extração de DNA de material de herbário. A = Extração de DNA utilizando CTAB 5 %; B = Extração de DNA com protocolo Doyle & Doyle (1987). Os DNAs quantificados nessa corrida foram respectivamente ANI1, AED3, AEX3 e ANI4. No quadrado os rastros de DNA.

Tabela 4. Quantificação do DNA utilizando NanoDrop.

Indivíduos	Concentração do DNA (ng/μL)	Absorbância 260/280
AEX1	783,3	1,72
AEX3	244,7	1,83
AED3	255,8	1,54
AED4	777,7	1,82
ACU3	1011	1,51
ACU4	238,6	1,69
ANI1	896,8	1,88
ANI4	196	1,59

A quantificação no NanoDrop revelou que o protocolo Doyle e Doyle extraiu significativa quantidade de DNA, mas como visto no gel está bem degradado. Foi possível

perceber também contaminação por proteínas na maioria das amostras, reveladas pelos valores menores que 1,8 na absorvância 260/280, onde o ideal são valores entre 1,8 a 2,0. Porém, como obteve material, continuou utilizando-as.

Os testes de gradiente de temperatura, do KIT de PCR e da reação com a enzima KAPA foram feitos juntos. Ambos apresentaram bom padrão de amplificação do DNA, revelado pelo aparecimento de bandas nítidas quando visualizadas em gel de agarose (Figura 3).

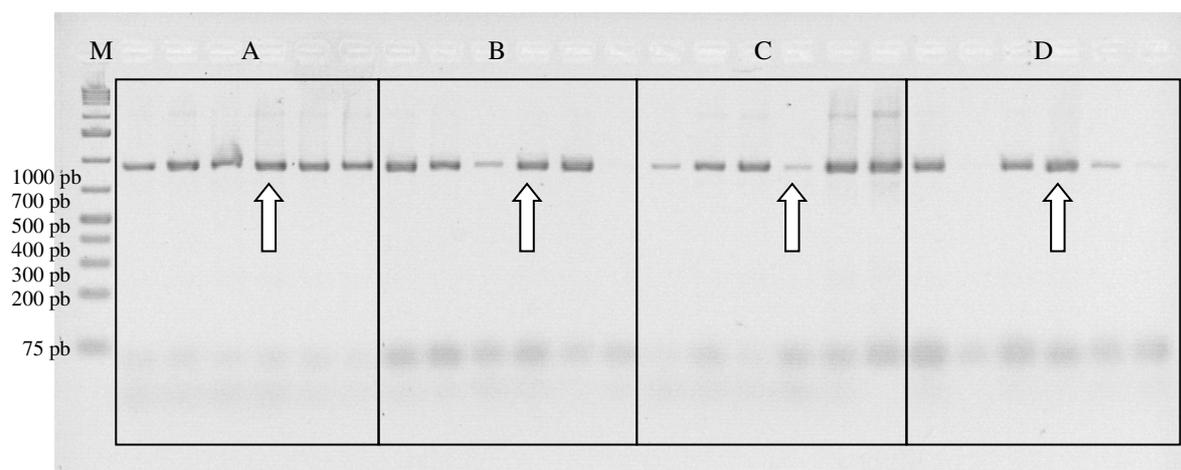


Figura 4. Visualização em gel de agarose do teste de PCR com o primer matK. A e B = reação com enzima KAPA e reação com KIT, respectivamente, usando um DNA; C e D = reação com enzima KAPA e reação com KIT, respectivamente, usando outro DNA; M = marcador 1Kb plus

A partir da visualização da reação em gel de agarose foi possível detectar que ambos os métodos apresentaram resultado satisfatório, amplificando nas temperaturas indicadas pelo autor (representadas pelas setas na figura 4) e apresentaram bandas bem definidas com ambos DNAs, revelando que estas são as temperaturas de melhor anelamento do primer. Este teste foi realizado com os dois primers, e obteve-se o mesmo resultado com relação à temperatura indicada pelo fabricante.

Desse modo, continuou-se utilizando a reação com a enzima KAPA, alterando apenas a concentração de DNA que aumentou para 10 ng, pois algumas bandas, como mostra a figura 4C, apresentaram banda pequena. Além disso, é possível perceber a presença de *primer* remanescente, como mostra a figura 5, e o aumento dessa concentração pode garantir o sucesso na amplificação do produto.

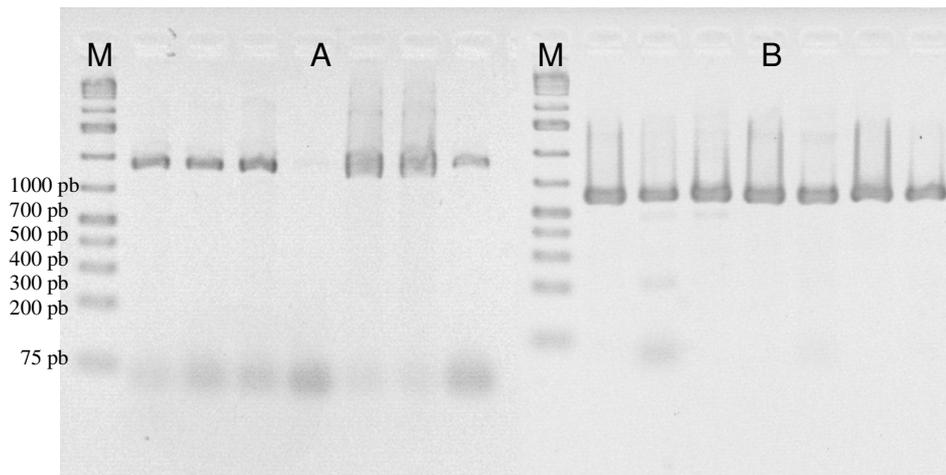


Figura 5. PCR com os indivíduos. A = primer matK; B = primer rbcL; M = marcador 1Kb plus.

Tendo feito os ajustes e determinado a temperatura de anelamento dos primers, foram feitas as ampliações com todos os indivíduos. As espécies que estavam no laboratório amplificaram 100% com os dois primers, porém as espécies retiradas de herbário apenas amplificaram a região rbcL (figura 6). Isso pode ter acontecido devido a região matK nessas amostras estarem degradadas, já que se sabe que, apesar de uma alta concentração, esses DNAs estão degradados.

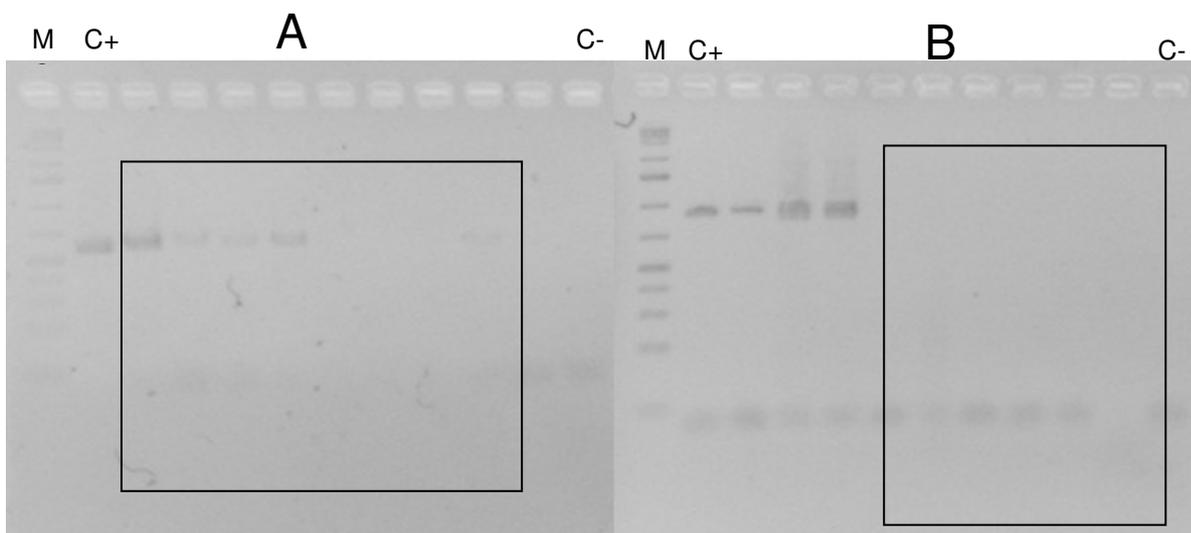


Figura 6. Testes de PCR. A = primer rbcL. B = primer matK. M = Marcador 1 kb plus; C+ = controle positivo; C- = controle negativo. N quadro preto as amostras de herbário.

O sequenciamento foi feito das amostras que apresentaram boa amplificação, 6 indivíduos para matK e 14 indivíduos para rbcL. A análise do eletroferograma mostrou que a qualidade do sequenciamento da maioria das amostras de herbário (figura 7) ficou inferior às restantes (figura 8). Isso pode ser percebido pelo tamanho dos picos, que são mais baixos, e por eles estarem mais sobrepostos, o que impede a determinação exata das bases, gerando incerteza no resultado. Isto ainda é devido da baixa quantidade de DNA extraído dessas amostras, mostrando a dificuldade de trabalhar com amostras provenientes de herbários.

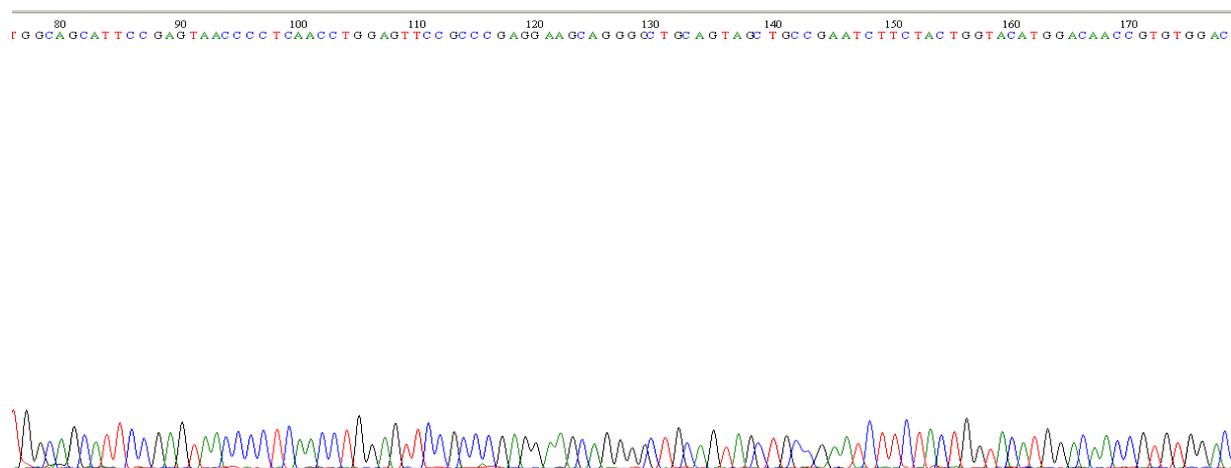


Figura 7. Parte do eletroferograma de amostra de herbário.

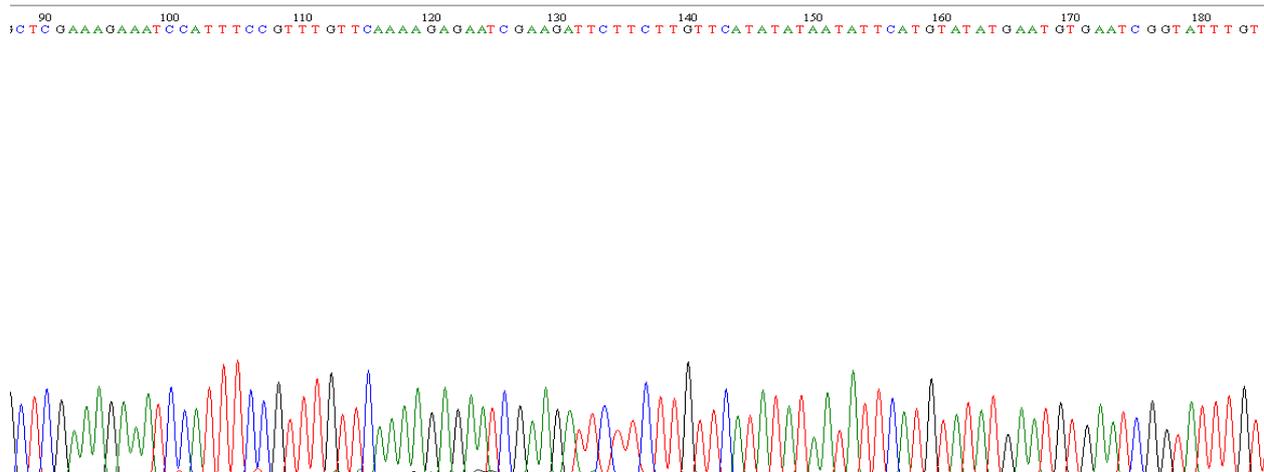


Figura 8. Parte do eletroferograma de amostra que já havia sido conservada em laboratório.

Através das sequências forward e reverse obtidas foi formada a sequência

consenso. Para matK somente 3 espécies geraram consenso, visto que nenhuma amostra de herbário amplificou para este marcador, e para rbcL 4, pois a qualidade do sequenciamento das amostras estava baixa e com isso apenas uma amostra de herbário formou. Com os consensos de todos os indivíduos e das outras espécies retiradas do GenBank foi feito o alinhamento (figura 9).

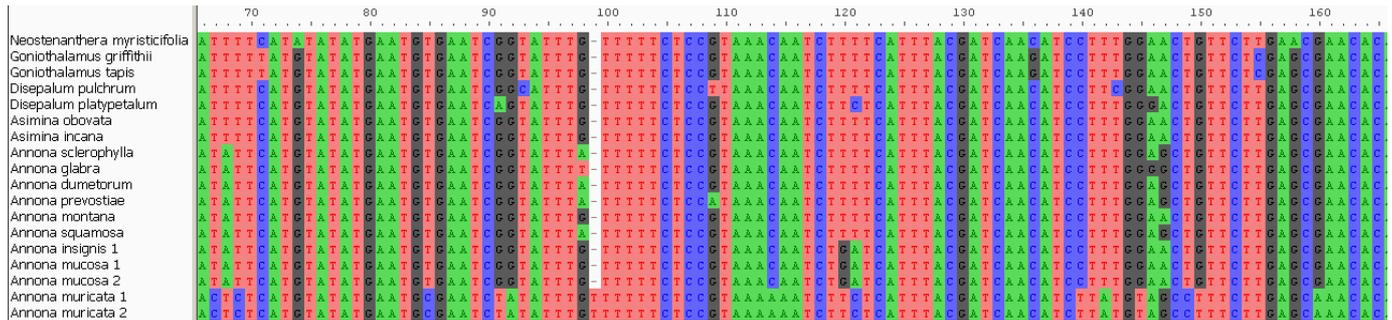


Figura 9. Alinhamento para amostras de matK

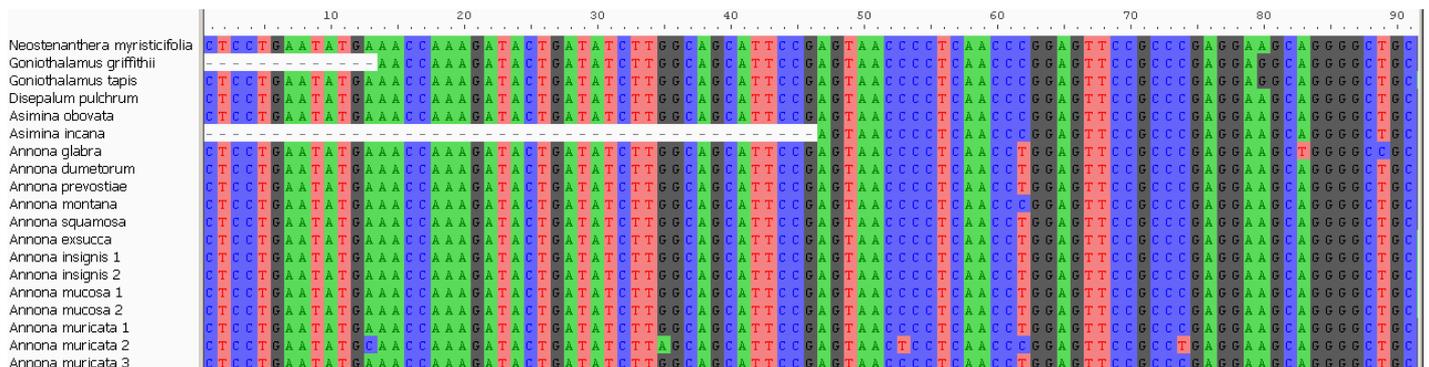


Figura 10. Alinhamento rbcL

A matriz de alinhamento da região matK compreende 690 pb e da região rbcL 400 pb. Os níveis de variação informativa nas regiões de matK para *Annona* foram altos, mas nas regiões de rbcL foram baixos, no entanto a variabilidade encontrada dos dois marcadores juntos é suficiente para diferenciar as espécies e identificar os possíveis parentes. Isso é percebido quando se analisa indivíduos da mesma espécie, pois é visto que sofrem as mesmas mutações, quando comparadas a uma espécie diferente.

O trabalho realizado por Colleta (2015) revela que rbcL apresentou eficiência de 100 % na identificação de suas espécies, e o trabalho de Alves (2013) mostrou que a



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

utilização de matK para discriminação de espécies é mais eficiente quando analisado junto com outra região. No trabalho de Lopes (2011) foi avaliado o sucesso na discriminação de espécies utilizando essas duas regiões barcode e observou-se que a região rbcL não obteve tanto sucesso com angiospermas quando comparado a matK, porém quando utilizadas em conjunto foram capazes de analisar mais de 70 % das plantas estudadas.

As sequências obtidas pelo sequenciamento foram submetidas ao banco de dados GenBank com o ID 1963663, porém estas só estarão disponíveis para acesso a partir de novembro de 2017 visto que ainda deverá ser publicado artigo do trabalho onde serão inseridas as sequências. Em anexo documento enviado pelo ncbi comprovando a submissão das sequências na plataforma.

A análise filogenética suportou o monofiletismo do gênero *Annona* como descrito por Rainer (2007) (figura 11). A relação entre *Annona* e os outros gêneros utilizados como grupo externo foi proposto em estudos filogenéticos baseados em dados moleculares (Chatrou et al. 2012), que foram sustentadas com esse trabalho.

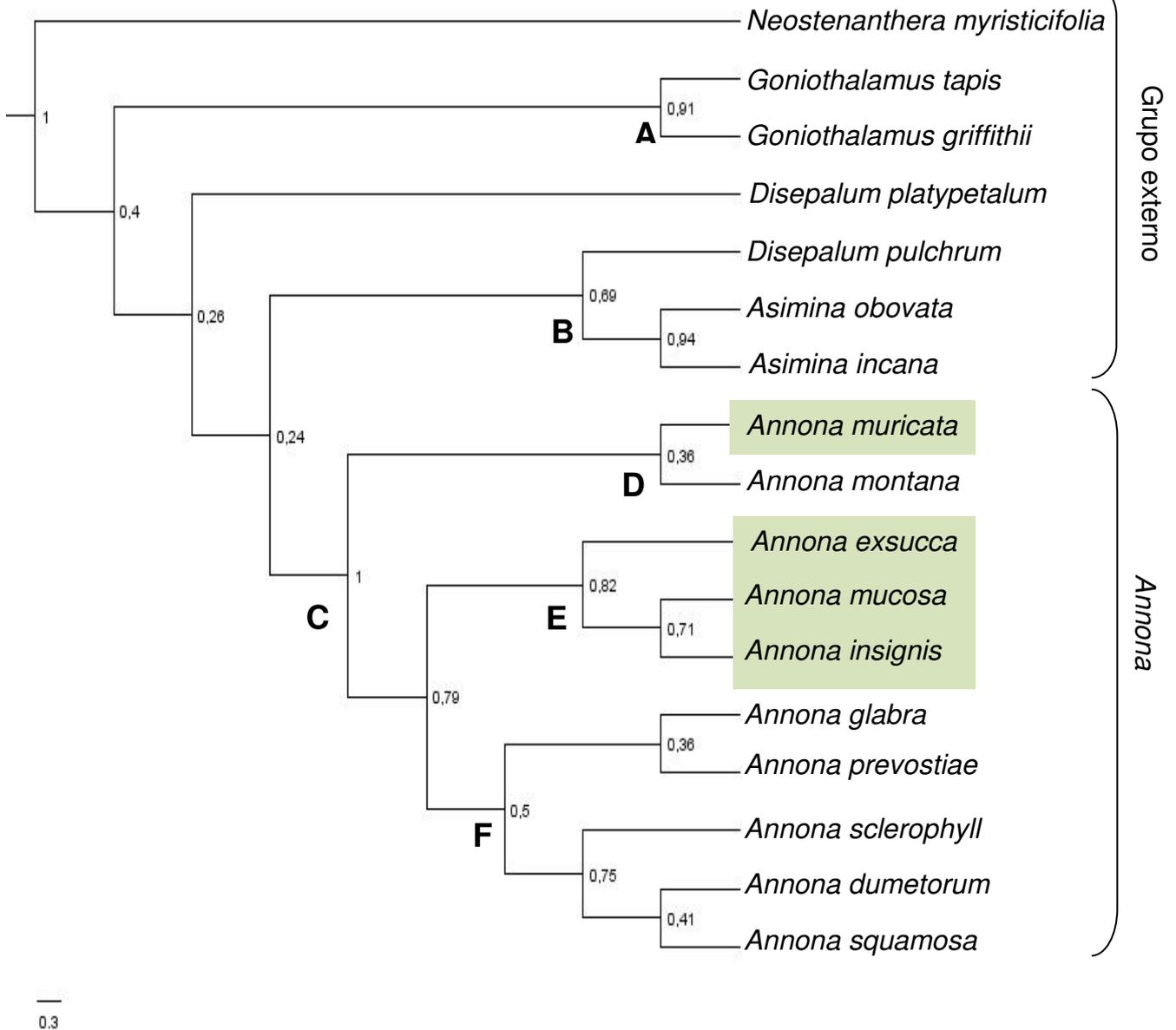


Figura 11. Árvore de consenso de maioria derivada das análises de Baysiana para espécies de *Annona* e gêneros relacionados, baseada nas regiões do DNA de cloroplasto *rbcL* e *matK*. Ramos em verde correspondem aos indivíduos do trabalho.

Nos clados A e B estão agrupados os gêneros pertencentes ao grupo externo, que possuem familiaridade com *Annona*, pois evoluíram de um ancestral em comum. Estes dados foram comparados com os obtidos por Chatrou et al. (2012) e houve diferença de agrupamento de *Disepalum* e *Asimina*

Annona se dividiu em três grupos principais: o subclados D, E e F. Nosubclado D nota-se o grande parentesco entre duas espécies, uma utilizada neste trabalho e outra



retirada de banco de dados. É interessante notar a estreita relação das ex-Rollinia com as Annonas, sustentado a ideia de que suas reclassificações se deram de maneira correta.

As espécies *A. exsucca* e *A. insignis* possuem características morfológicas muito semelhantes a *A. mucosa*, o que leva a pensar que podem ser parentes silvestres, no entanto não há comprovação científica para essa afirmação, porém analisando o subclado E nota-se que elas foram agrupadas juntas, revelando a grande semelhança genética entre elas. Seria possível imaginar que *A. exsucca* é o parente silvestre, pois ela evoluiu primeiro e sozinha, e as outras espécies surgiram a partir disso, porém outras análises deverão ser feitas para comprovar esse dado.

8. Referências

AKAIKE, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.* 19: 716-723.

ALMEIDA, J. R. G. da S.; ARAÚJO, E. C. da C.; RIBEIRO, L. A. de A.; LIMA, J. T. de; NUNES, X. P.; LÚCIO, A. S. S. C.; AGRA, M. de F.; BARBOSA FILHO, J. M. 2012. Antinociceptive activity of ethanol extract from *duguetia chrysocharpa maas* (*Annonaceae*). *The Scientific World Journal*, 2012: 6.

ALVES, T. L. da S. 2013. Aplicação de DNA barcoding para identificação de espécies pertencentes as tribos Sisyrinchieae e Tigridieae (Iridaceae). Dissertação (Doutorado) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

AZEVEDO, V. C. R.; INGLIS, P. W.; GAIOTTO, S. A. 2012. Identificação Molecular de Plantas em Regiões Tropicais – Dificuldades e Desafios. *Heringeriana Brasília*. vol 6, n. 1, p. 29-31.

CBOL, Consortium for the Barcode of Life, History of CBOL (disponível em <http://barcoding.si.edu/history.html>, acesso em 15/01/2016).

CHATROU, L. W.; COUVREUR, T. L. P.; RICHARDSON, J. E. 2009. "Spatio-temporal Dynamism of Hotspots Enhances Plant Diversity." *Journal of Biogeography* 36 (9)



UFAM

(September):

1628–1629.

doi:10.1111/j.1365-2699.2009.02179.x.

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2699.2009.02179.x>.

--; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169, 5–40.

CLEMENT, C. R.. 1999. "1492 And The Loss Of Amazonian Crop Genetic Resources. I. The Relation Between Domestication And Human Population Decline." *Economic Botany*, 53 (2): 188–202.

---. 2001. Melhoramento de espécies nativas {Improvement of native species}. In: Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C. (Eds.). Recursos genéticos & melhoramento - plantas. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso - Fundação MT, Rondonópolis, MT. pp. 423-441. (Brasil).

COLLETA, G. 2015. Uso do rbcL na identificação das espécies arbóreas da Floresta Estacional Semidecidual do estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L. de; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. 2011. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* mart. (*Annonaceae*). *Molecules*, 16: 9714-9720.

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.

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.8.2. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.



ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M. A.; HORMAZA, J. I. 2004. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 746–748.

HEBERT, P. D. N., A.; CYWINSKA, S. L. B.; J. R. DEWAARD, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society of London*, 270:313-321.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. 2010. Bayesian inference of species-trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* 27: 570-580.

IBOL, International Barcode of Life Project, What is IBOL, (disponível em <http://ibol.org/about-us/what-is-ibol/>, acesso em 15/01/2016).

LOPES, S. M. M. de B. 2011. Botânica molecular forense: O DNA na identificação de espécies vegetais. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Forenses. Universidade do Porto.

LOPES, J. de C.; MELLO-SILVA, R. 2014. Diversidade e Caracterização das Annonaceae no Brasil. *Rev. Bras. Frutic.* vol. 36, p. 125-131.

PATIÑO, V. M. R. 2002. Historia y Dispersion de Los Frutales Natives Del Neotrópico. Cali, Colombia.

POSADA, D. 2008. JModeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*: 1253-1256.

PROSDOCIMI, F.; SANTOS, F. R. 2004. Sobre bioinformática, genoma e ciência. *Ciência Hoje*, vol. 35, nº 209.

RAINER, H. 2007. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* : Serie B: für Botanik und Zoologie, *Ann Arbor*, v. 108, p. 191-205.



UFAM

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. 2007. Tracer v1.4, website <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

RANNALA, B.; YANG, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal Molecular Evolution* 43: 304-311.

RIBEIRO, L. do P.; VENDRAMIM, J. D.; BICALHO, K. U.; ANDRADE, M. dos S.; FERNANDES, J. B.; MORAL, R. de A.; DEMÉTRIO, C. G. B. 2013. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 55: 6-14.

RICHARDSON, J. E.; CHATROU, L. W.; MOLS, J. B.; ERKEN, R. H. J.; PIRIE, M.D. 2004. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: *Annonaceae* and *Rhamnaceae*. *The Royal Society*, p. 1495-1508.

RITLAND, K.; CLEGG, M. T. 1987. Evolutionary Analysis Of Plant Dna Sequences. *The American Naturalist*, v. 30.

SANTOS, F. R.; GUIMARÃES, P. E. M.; REDONDO, R. A. F. 2002. Bancos De DNA: Coleções Estratégicas Para Estudos Da Biodiversidade. *Lundiana*, 3(2):93-98.

SOARES, J. D. R.; DIAS, G. de M. G.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A. 2014. Caracterização Anatômica E Citométrica Em Biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.]). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 36, n. spe1, p. 272-280.

SOBRINHO, R. B. 2010. Potencial De Exploração De *Annonaceas* No Nordeste Do Brasil. In: *Semana Internacional De Fruticultura, Floricultura E Agroindústria*, 17^º.; Fortaleza.

YANG, Z.; RANNALA, B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14, 717-724.

9. Cronograma de Atividades



ANEXO A – Comprovante de submissão das sequências

BankIt

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?form=fi...>

BankIt

Logged in as Thamiles Goncalves (thamilesg) [Log out](#)

GenBank Submissions

Submission # 1963663

Submission Completed

Thank you for using the GenBank Submissions Tool.

You have requested that your sequence data be released on **November 14 2017**.

Your Submission ID is **1963663**. This is *not* an accession number. GenBank accession numbers will be assigned to your submissions and sent to you by email within two working days, unless there are issues with your submission that we must ask you to explain first. If you have any questions or corrections regarding your submissions before you receive these, be sure to refer this Submission ID in your email.

Your submission data have been sent to GenBank. For each complete sequence submission, you will receive the following at the email address you provided:

1. an automatic reply confirming our receipt of your submissions;
2. GenBank accession numbers (within two working days); and
3. the final GenBank records, processed by the GenBank Annotation staff and incorporating the information you have provided for you to review before they are released to the public database.

If you do not receive this information from us by email within the time frame indicated, please send an inquiry to gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov and be sure to include the Submission ID and the email address used in your submission.

[Start a New Submission](#)