



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL
MESTRADO



PAOLA GOMES SILVA

Identificação de ipês (Bignoniaceae) por DNA *barcoding*

Campo Grande – MS

Março – 2021

PAOLA GOMES SILVA

Identificação de ipês (Bignoniaceae) por DNA *barcoding*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Macedo Alves

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Pedroso Lorenz

Campo Grande – MS

Março – 2021

Ficha Catalográfica

Silva, Paola Gomes

Identificação de ipês (Bignoniaceae) por DNA *barcoding*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato do Grosso do Sul.

1. Identificação de espécies, 2. árvores urbanas, 3. *Handroanthus*, 4. *Tabebuia*, 5. *matK*, 6. *trnH-psbA*.

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Instituto de Biociências

Comissão Julgadora

Prof.^a Dr.^a Edihanne G.
Arguelho

Prof.^a Dr.^a Gecele
Matos Paggi

Dr.^a Priscila C. da Costa

Dr. Wellington S.
Fava

Prof. Dr. Flávio Macedo Alves
Orientador

Dedicatória

Dedico essa dissertação de mestrado à minha querida e amável mãe, que possibilitou os meus estudos desde pequena. Que tanto trabalhou para que nada me faltasse enquanto eu estudava, que sempre foi compreensível com minhas obrigações, que sempre reconheceu meu estudo como meu trabalho, que sempre me incentivou a estudar. A ela, que sempre me apoiou nas minhas decisões. Sem você, mãe, eu não teria conseguido. Obrigada por tudo e por tanto. Te amo infinitamente.

Dedico também à memória do meu vovozinho João, que estaria transbordando de orgulho e felicidade se estivesse presente fisicamente.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, eu agradeço a Deus pela oportunidade que me concedeu de cursar o mestrado e realizar um sonho. Agradeço a minha mãe, que tanto me ajudou para que eu pudesse ingressar na pós-graduação, palavras não são suficientes para expressar a minha gratidão a senhora. Agradeço ao meu irmão e amigo Cássio, que sempre me apoiou, incentivou e acreditou em mim, que sofria o dia a dia das angústias de trabalhos, prazos e aulas comigo. Agradeço ao meu pai, que me ajudou com tantas caronas e lanches, que não se importava em parar o que estava fazendo ou em atravessar a cidade para poder me buscar/levar. Ao meu Maninho Guilherme que sempre esteve disposto a ajudar, que me levava água mesmo sem eu pedir ou com suas doces palavras. Ao Samuel, meu amor, que sempre me incentivou, sempre me colocou pra cima e enxergou o melhor de mim mesmo quando eu não conseguia ver. Eu amo demais cada um de vocês, minha família. Muito Obrigada por tudo!

Agradeço imensamente ao meu querido orientador professor Dr. Flávio Macedo Alves, que está comigo desde a graduação, que sempre acreditou em mim. Obrigada pelo privilégio da oportunidade de poder aprender mais contigo. Obrigada por disponibilizar seu tempo para me ajudar com as coletas, por me ensinar a identificar e coletar, por sempre me explicar tudo com muita paciência e detalhes. Agradeço a minha querida coorientadora professora Dr.^a Aline Pedroso Lorenz, que me acolheu no laboratório desde a graduação. Que é paciente, que sempre me deu ótimos direcionamentos, que tanto me ensina e me inspira. Agradeço ao meu querido coorientador Dr. Weg, que entrou de cabeça no projeto, me disponibilizou muito de seu tempo e de seu conhecimento para que eu pudesse executar meu trabalho. Que me ensinou a fazer cada análise, que sempre me explicou com muita paciência, que me deu excelentes contribuições ao meu trabalho, desde a correção do projeto. Que sempre me deu apoio emocional toda a vez que eu estava aflita, ansiosa, perdida, sempre me fez acreditar que estava tudo bem e que daria tudo certo. Sem vocês três não seria possível eu ter feito esse trabalho tão bem feito. Sou muito grata e feliz por ter vocês como time aqui comigo. Obrigada demais!

Agradeço a turma toda do LEBio, a cada um dos amigos que eu fiz ali. A cada cafezinho, cada risada, cada choro, cada comemoração, cada incentivo, cada palpite, agradeço por todo o apoio. Vocês fizeram essa caminhada mais leve. Sou muito feliz por tê-los em minha vida. Obrigada!

Agradeço as minhas amigas e amigos por todo o carinho e apoio durante o tempo de curso. Que se mostravam interessadas em saber mais da minha pesquisa, em saber como estavam as coisas, ao ouvir meus lamentos quando as coisas estavam difíceis e em todo apoio emocional que me deram. Vocês são incríveis. Amo vocês.

Agradeço a todos que tiveram envolvidos neste trabalho, de forma direta ou indireta. Agradeço a Edihanne, que me ensinou todo o processo laboratorial na graduação, aos professores de todas as disciplinas, que sempre estiveram dispostos a colaborar, as minhas colegas de turma, aos membros de bancas, a coordenação e secretaria do curso... A todos vocês, muito obrigada.

Por fim, e com a mesma importância, agradeço a UFMS, que me acolhe desde a minha graduação e ao CNPQ pela concessão da bolsa durante todo o meu curso. Muito obrigada!

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Resumo Geral.....	7
Abstract.....	8
Introdução geral	9
Objetivos.....	12
Referências.....	13
Artigo.....	17
1. Introdução	19
2. Material e métodos	21
3. Resultados	24
4. Discussão	25
5. Conclusão.....	27
Referências.....	28

Resumo Geral

Ipês são árvores ou arbustos da família Bignoniaceae amplamente utilizadas em arborização urbana em todas as regiões do Brasil. No inverno essas plantas perdem a maioria de suas folhas e as substituem por cachos de flores de cores intensas e muito apreciadas no paisagismo. Ainda que sejam de uso frequente na vegetação urbana e de grande apreciação popular, algumas espécies ainda não estão representadas nos bancos de sequências de DNA públicos e outras não estão corretamente identificadas, havendo inclusive problemas de indicação de gênero. O DNA *barcoding* é uma ferramenta de identificação molecular que utiliza pequenas sequências de DNA para a identificação de espécies. Para ser considerado um bom DNA *barcode*, a região genômica precisa atender a determinados critérios, como: 1) ser de fácil amplificação em laboratório; 2) resultar sequências curtas e, 3) ser suficientemente variável para discriminar taxa a nível de espécie. Neste estudo, utilizamos dois dos marcadores plastidiais indicados pelo *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), o gene *matK* e o espaçador intergênico *trnH-psbA*, para verificar o seu potencial de identificação de espécies de ipês urbanos da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Foram estudadas 12 espécies popularmente conhecidas como ipês dos gêneros *Cybistax*, *Handroanthus*, *Jacaranda*, *Tabebuia* e *Tecoma*. Nossos resultados sugerem que o marcador *trnH-psbA* é o melhor candidato locus único para identificar as espécies de ipês, quando comparado com o *matK*, enquanto os resultados baseados nos marcadores concatenados (*matK* + *trnH-psbA*), indicaram a mesma taxa de eficiência de identificação que o *trnH-psbA*, porém com suporte de ramos mais elevados. Nas análises de BLAST, obtivemos pouco sucesso na identificação das espécies. Isso se deve ao fato de o banco de dados público de sequências de DNA não contemplar todas as espécies abordadas neste estudo e também por conter sequências de baixa qualidade. Isso demonstra a necessidade de um banco de dados local para a identificação através de DNA *barcoding* e também a necessidade de mais estudos que disponibilizem sequências de DNA de alta qualidade, com acurácia taxonômica.

Abstract

Ipês are trees or shrubs of the Bignoniaceae family widely used in urban afforestation in all regions of Brazil. In winter these plants lose most of their leaves and replace them with bunches of flowers of intense colors very appreciated in landscaping. Although they are frequently used in urban vegetation and are highly popular, some species are not yet represented in the public DNA sequence banks and others are not correctly identified, even with gender indication issues. DNA barcoding is a molecular identification tool that uses small DNA sequences to identify species. To be considered a good DNA barcode, the genomic region must follow certain criteria, such as: 1) be easily amplified in the laboratory; 2) result in short sequences; and 3) be sufficiently variable to discriminate taxa at the species level. In this study, we used two of the plastid markers indicated by the Consortium for the Barcode of Life (CBOL), the *matK* gene and the intergenic spacer *trnH-psbA*, to verify their potential for identifying species of urban ipê trees in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. We study 12 species popularly known as ipê of the genera *Cybistax*, *Handroanthus*, *Jacaranda*, *Tabebuia* and *Tecoma*. Our results suggest that the *trnH-psbA* marker is the best single locus candidate to identify the ipês' species, when compared to *matK*, while results based on concatenated markers (*matK* + *trnH-psbA*), indicated the same efficiency rate of identification as *trnH-psbA* only, but supported by higher branches. In the BLAST analyzes, we have had little success in identifying the species. This is because the public DNA sequence database does not include all species covered in this study and presents low quality sequences. This demonstrates the need for a local database for identification through DNA barcodes and for more studies that provide high quality DNA sequences, with taxonomic accuracy.

Introdução geral

Bignoniaceae

A família Bignoniaceae apresenta cerca de 840 espécies e 82 gêneros, com distribuição predominantemente Pantropical, sendo que aproximadamente 80% de suas espécies ocorrem na região Neotropical, sendo metade no Brasil (Lohmann, 2015). Os representantes da família são árvores, arbustos, lianas e ervas, amplamente utilizados em arborização urbana e construção civil, devido a dureza e resistência da madeira, e algumas espécies são utilizadas na medicina popular (Lohmann, 2015).

Os ipês são árvores e arbustos caracterizados principalmente por apresentarem flores tubulares, campanuladas, vistosas, de cores intensas, geralmente dispostas em cachos. No inverno perdem suas folhas e exibem suas flores que, quando caem, formam um “tapete” de flores abaixo da árvore característico. Espécies conhecidas popularmente como ipês são observadas nos gêneros *Cybistax* Mart. ex Meisn., *Handroanthus* Mattos, *Jacaranda* Juss., *Tabebuia* Gomes ex DC. e *Tecoma* Juss. (Gentry, 1992).

O gênero *Cybistax* pertence ao clado Aliança *Tabebuia* (Olmstead et al., 2009). Apresenta uma única espécie, *Cybistax antisyphilitica*, que é conhecida popularmente como ipê-verde por exibir flores verde-claras. Se apresenta como árvore ou arbusto de 1,5-20 m de altura, com casca grossa e com fissura vertical. A madeira é usada na construção e a planta nas medicinas popular e tradicional. Ocorre no Paraguai, Bolívia, Argentina, Peru e Brasil (Gentry, 1992). No Brasil, é encontrada em todos os estados do Centro-Oeste, Sul e Sudeste, no Nordeste, ocorre nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí e no Norte, nos estados de Tocantins e Pará (Flora do Brasil, 2020).

O gênero *Handroanthus* fez parte do gênero *Tabebuia* por muito tempo (Gentry, 1992), mas Grose e Olmstead (2007), através de estudos moleculares e filogenéticos, separaram os dois gêneros. Os dois se diferenciam principalmente por *Handroanthus* apresentar cálice campanulado, corola subcampanulada ou infundibuliforme, ovário bilocular com 8-9 óvulos, folhas digitadas 3-7 foliolada. *Handroanthus* tem sido bastante estudado por suas propriedades medicinais e sua madeira tem alto valor comercial no mercado por ser muito pesada, e é a segunda mais exportada em volume no Brasil e, por isso, merece atenção especial para a preservação de espécies nativas (Venancio, 2017).

O gênero *Jacaranda* é representado por árvores, arbustos ou subarbustos, com folhas bipinadas ou pinadas, raramente simples. Suas inflorescências são terminais ou laterais, de cor

azul, lilás ou roxa. Abrange 48 espécies neotropicais, e no Brasil, ocorrem 36 espécies (Flora do Brasil, 2020). *Jacaranda cuspidifolia* Mart. apresenta de 3-10 metros de altura, muito utilizada na ornamentação por apresentar flores em tons de roxo. Floresce nos meses de setembro a dezembro. A raiz apresenta propriedade inseticida, a planta é utilizada no tratamento da sífilis e blenorragia, e suas folhas e cascas são usadas contra a febre (Arruda et al., 2012).

O gênero *Tabebuia* é o maior da família Bignoniaceae, possui cerca de 100 espécies sendo muitas delas, de grande valor na ornamental e madeireiro. Das 100 espécies que podem ser arbustos até árvores, 40 são conhecidas como “ipês”. O gênero passou por várias alterações taxonômicas ao longo do tempo, e hoje ainda é considerado complexo do ponto de vista da Taxonomia (Santos, 2017). Espécies de *Tabebuia* são muito utilizadas na ornamentação devido suas inflorescências vistosas e também porque sua madeira está entre as mais resistentes e pesadas do Neotrópico (Gentry, 1992). De acordo com Olmstead et al., (2009), este gênero está incluso no clado Aliança Tabebuia. Ocorre desde o sudoeste dos Estados Unidos até o norte do Chile e Argentina (Santos, 2017). No Brasil está presente em quase todos os estados, à exceção de Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Flora do Brasil, 2020).

O gênero *Tecoma* possui 14 espécies distribuídas desde o sudoeste dos Estados Unidos até a América do Sul (Olmstead et al., 2009). No Brasil, há somente uma espécie (*Tecoma stans*), que ocorre no Centro Oeste, Sudeste e no estado de Santa Catarina (Flora do Brasil, 2020). *Tecoma stans* é um arbusto ou árvore pequena, de até 10 metros de altura. Seus usos estão na ornamentação e medicina popular. Possui inflorescências com flores amarelas (Gentry, 1992).

DNA *Barcoding*

O ramo de estudos da Genética ganhou um grande *upgrade* com a descoberta da estrutura tridimensional do DNA por Francis Crick e James Watson em 1953. Este acontecimento abriu novos caminhos e possibilidades para os estudos em diversas áreas ligadas à vida, como a Genética Molecular (Revista da Associação Médica Brasileira, 2005). Esta área, ao longo dos últimos anos, vem sendo transformada com tecnologias que permitem, dentre outras coisas, a identificação genética de espécies e de populações (Bueno-Silva, 2012).

Em 2003, Hebert e colaboradores propuseram a metodologia do DNA *barcoding*, que é uma ferramenta de identificação biológica que utiliza o DNA como um código de barras. Para uma sequência de DNA ser considerada como um código de barras de DNA, alguns

critérios precisam ser atendidos. A sequência deve ser pequena, mas suficientemente variável para separar espécies irmãs e apresentar sítios conservados para a construção de *primers* (marcadores) universais (Ford et al., 2009). Além da seleção dos marcadores e da obtenção das sequências selecionadas, é necessário que haja uma biblioteca de sequências para a comparação (Ford et al., 2009). A identificação biológica por DNA *barcoding* para animais tem sido utilizada em larga escala por meio de sequências curtas do citocromo c oxidase subunidade I (COI) (Hebert et al., 2003). Em animais o uso do gene mitocondrial COI tornou-se padrão por ser eficiente na identificação e atender aos requisitos para ser um bom *barcode*. Testes utilizando este marcador têm reportado próximo de 100% de eficácia (Barrett e Hebert, 2005; Hajibabaei et al., 2007), indicando acurácia para o método em animais (Meyer e Paulay, 2005).

Entretanto, os genes mitocondriais nas plantas apresentam baixa e lenta variação, (Hebert et al., 2003). Com o objetivo de tentar uniformizar as sequências denominadas como DNA *barcoding* para plantas e criar um banco de dados de referência, foi criado o *Consortium for Barcoding of life* (CBOL). O CBOL é uma organização internacional composta por mais de 200 instituições de 50 países, que visa estimular e desenvolver uma base de dados de sequências moleculares para a criação e alimentação de uma biblioteca mundial de identificação de espécies (CBOL Plant Working Group 2009). Segundo o CBOL (2009), os principais critérios para selecionar um marcador para identificação de plantas são: facilidade de amplificação e sequenciamento; qualidade das sequências com pouca ou nenhuma ambiguidade; e capacidade de distinção das espécies. Assim, o CBOL passou a sugerir o uso de marcadores plastidiais para as plantas (Azeredo, 2005; CBOL Plant Working Group, 2009).

O CBOL (2009) elegeu o *locus matK* como código de barras das plantas. O gene plastidial *matK* codifica uma proteína chamada de Maturase K, tem aproximadamente 1.500 pares de bases, possui alta taxa de evolução, está presente em todas as plantas e apresenta bom papel na identificação tanto a nível de ordem e família quanto a nível de gênero e espécie (Pinto, 2015). Todavia, admite-se que este marcador não consegue cobrir todos os grupos de plantas, havendo a necessidade de um ou mais marcadores adicionais. Tendo em vista que apenas um marcador não é tão eficiente para identificação das plantas em muitos casos, outra opção sugerida pelo CBOL (2009) é o espaçador intergênico não transcrito *trnH-psbA*, que é composto de 200 a 500 pares de base, é de fácil amplificação e apresenta alta variação de nucleotídeos (Kress et al., 2005). As regiões plastidiais sugeridas, têm sido utilizadas com sucesso por pesquisadores como Kress et al. (2010), Parmentier et al. (2013), Braukmann et al. (2017), Mosa et al. (2019) para diferentes espécies/famílias de plantas, e Bolson et al. (2015)

e Laha et al. (2017) para Bignoniaceae. Alguns pesquisadores incluem alguns marcadores plastidiais como *trnL-F*, *ndhF* e *psbK* e ainda, o marcador nuclear *ITS* em seus estudos para melhorar seus resultados (Mosa et al., 2019; Cameron, 2009).

A utilização de marcadores moleculares na identificação biológica contribui de forma importante em pesquisas de taxonomia, filogenia, genética de populações e genética da conservação. Além disso, os estudos moleculares com plantas possibilitam o armazenamento de tecidos e do DNA genômico extraído. Essas amostras conservadas são matéria-prima para pesquisas em filogenia, genética de populações e estudos filogeográficos (Hajibabaei et al., 2007). Apesar de a utilização de marcadores moleculares na identificação biológica ser importante, ainda não existem grandes estudos com testes críticos para avaliar a contribuição da utilização de marcadores moleculares na identificação de plantas para inventários de biodiversidade (Lahaye et al., 2008). As informações geradas pelos marcadores moleculares podem complementar estudos de ecologia, morfologia, evolução, taxonomia, entre outras áreas por enriquecerem o conhecimento genético, subsidiar seleção de genes específicos, entre outras aplicações (Embrapa Cerrado, 2011).

Atualmente, as espécies de plantas são identificadas baseadas em características morfológicas. Todavia, em alguns casos, quando há necessidade de identificação de material biológico fragmentado, em estado vegetativo ou juvenil, as características morfológicas utilizadas na Taxonomia clássica são insuficientes. A análise de sequências de DNA poderia resolver tal problema, ajudando taxonomistas a confirmar identificações. Por essa razão, fica claro que a integração da Taxonomia tradicional com a utilização de técnicas de identificação molecular, permitirá a máxima eficiência na identificação de material biológico (Chase et al., 2005; CBOL Plant Working Group, 2009). A incorporação de sequências de DNA na taxonomia em estudos de biodiversidade, poderá potencialmente aumentar a confiabilidade na identificação da espécie (Tautz et al., 2003) e a sua combinação com outros dados ampliará ainda mais sua finalidade (Kress et al., 2005; Wiemers e Fiedler, 2007).

Objetivos

Objetivo geral

Utilizar a técnica do DNA *barcoding* com os marcadores moleculares *matK* e *trnH-psbA* para identificar espécies conhecidas como ipês.

Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência dos marcadores plastidiais *trnH-psbA* e *matK* separadamente e em conjunto, para a identificação de espécies de “ipês”;
- Criar um banco de dados local das sequências de DNA com os marcadores moleculares *trnH-psbA* e *matK* para as espécies conhecidas como “ipês” dos gêneros *Cybistax*, *Handroanthus*, *Jacaranda*, *Tabebuia* e *Tecoma*;
- Contribuir com o banco de dados mundial de DNA *barcodes*, depositando no GenBank as sequências de DNA geradas neste estudo;
- Ampliar e estimular os conhecimentos taxonômicos e genéticos de espécies de Bignoniaceae;

Referências

- A descoberta do DNA e o projeto genoma. 2005. Revista Associação Médica Brasileira 51, 1.
- Arruda, A.L.A., et al. 2012. Análise fitoquímica e atividade antimicrobacteriana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 14, 2.
- Azeredo A.M.L. 2005. O Código de barras da vida baseado no DNA “*Barcoding of Life*”: considerações e perspectivas. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. CBMEG UNICAMP.
- Barret R.D.H., Hebert, P.D.N. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. Canadian Journal of Zoology 83, 481–491.
- Bolson, M., Smidt E.d.C, Brotto M.L., Silva-Pereira, V. 2015. ITS and *trnH-psbA* as Efficient DNA Barcodes to Identify Threatened Commercial Woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. Plos one 10, e0143049.
- Braukmann, T.W., Kuzmina, M.L., Sillis, J., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N. 2017. Testing the efficacy of DNA barcodes for identifying the vascular plants of Canada. PloS one, 12, e0169515.
- Bueno-Silva, M. 2012. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. Estudos de Biologia, 34, 83.

- Cameron, K.M. 2009. On the value of nuclear and mitochondrial gene sequences for reconstructing the phylogeny of vanilloid orchids (Vanilloideae, Orchidaceae). *Annals of Botany* 104, 377–385.
- CBOL, Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Chase, M., Cowan, R., Hollingsworth, P., Van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Wilkinson, M. 2007. A Proposal for a Standardised Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon* 56, 295-299.
- Embrapa. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. 2011. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 2.
- Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB114027>>. Acesso em: 29 Mar. 2019.
- Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., et al. 2009. Selection of candidature coding DNA Barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Gentry, A.H. 1992. Bignoniaceae: Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica*, 25, 1370.
- Grose, S.O., Olmstead, R.G. 2007. Taxonomic Revisions in the Polyphyletic Genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). *Systematic Botany*, 32, 660–670.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23, 167–172.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270, 313–321.
- Kress, W.J., Erickson, D.L., Swenson, G., Thompson, J., Uriarte, M., Zimmerman, J.K. 2010. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot. *PLoS one*, 5, e15409.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 8369-8374.
- Laha, R.C, De Mandal, S., Ralte, L., et al. 2017. Meta-barcoding in combination with palynological inference is a potent diagnostic marker for honey floral composition. *AMB Expr* 7, 132.

- Lahaye, R., Van Der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *PNAS* 105, 2923–2928.
- Lohmann, L.G. 2015. Check-list das Bignoniaceae do estado de Mato Grosso do Sul. *Iheringia, Série Botânica* 73, 157-162.
- Meyer, C.P., Paulay, G. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology* 3.
- Mosa, A.K., Gairola, S., Jamdade, R., et al. 2019. The Promise of Molecular and Genomic Techniques for Biodiversity Research and DNA Barcoding of the Arabian Peninsula Flora. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Olmstead, R.G., Zjhra, M.L., Lohmann, L.G., Grose, S.O., Eckert, A.J. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany* 96, 1731–1743.
- Parmentier, I., Duminil, J., Kuzmina, M., Philippe, M., Thomas, D.W., Kenfack, D., Hardy, O.J. 2013. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees. *PLoS One* 8, e54921.
- Pinto, I.B. 2015. Caracterização dos genes *matK* e *rbcL* e da variabilidade genética entre os acessos de araruta (*Maranta arundinacea* L.). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande.
- Santos, S.R. 2017. A atual classificação do antigo gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) sob o ponto de vista da anatomia da madeira. *Balduinia* 58, 10-24.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 18 70–74.
- Venancio, R. 2017. Chain of custody control of ipe timber (*Handroanthus* sp.) from the Amazon rainforest, using DNA fingerprint. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista – Ilha Solteira.
- Wiemers, M., Fiedler, K. 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* 4, 1–16.

Artigo a ser submetido na revista Flora.

<<https://www.elsevier.com/journals/flora/0367-2530/guide-for-authors>>

Artigo

Title: Identificação de ipês (Bignoniaceae) por DNA *barcoding*

Author names and affiliations: Paola Gomes Silva, Wellington Santos Fava, Aline Pedroso Lorenz, Flávio Macedo Alves

Silva, P.G. (corresponding author, gomesspaola@gmail.com)^{1,2}

Fava, W.S. (weg.fava@gmail.com)²

Lorenz, A.P. (alineplorenz@gmail.com)²

Alves, F.M. (flaurace@yahoo.com.br)³

¹ Post-Graduate Program in Plant Biology, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900 Brazil

² Laboratory of Ecology and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900 Brazil

³ Plant Systematics Laboratory, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900 Brazil

Resumo

Ipês são árvores ou arbustos da família Bignoniaceae características da região neotropical e amplamente utilizadas em arborização urbana em todas as regiões do Brasil. Para identificar espécies de ipês utilizamos a técnica do DNA *barcoding* e dois dos marcadores plastidiais indicados pelo *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), o gene *matK* e o espaçador intergênicos *trnH-psbA*. Estudamos 12 espécies popularmente conhecidas como ipês dos gêneros *Cybistax*, *Handroanthus*, *Jacaranda*, *Tabebuia* e *Tecoma* coletadas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Nossos resultados sugerem que o *barcode trnH-psbA* é o melhor candidato locus único para identificar espécies de ipês, quando comparado com o *matK*. Os resultados baseados nos marcadores concatenados (*matK+trnH-psbA*) indicaram a mesma taxa de eficiência de identificação que o *trnH-psbA*, porém com suporte de ramos mais elevados. As análises de BLAST revelaram que o banco de dados público de sequências de DNA não contempla todas as espécies abordadas neste estudo e também contém sequências de baixa qualidade. Há a necessidade de um banco de dados local para a identificação através de códigos de barras de DNA e também de trabalhos que disponibilizem sequências de DNA de qualidade com acurácia taxonômica.

Palavras-chave: identificação de espécies; árvores urbanas; *Handroanthus*; *Tabebuia*; *matK*; *trnH-psbA*.

1. Introdução

Os ipês são árvores ou arbustos da família Bignoniaceae muito utilizados na arborização urbana, especialmente pela beleza de sua floração. As espécies são caracterizadas por perderem as folhas no inverno, sendo substituídas por grandes cachos de flores grandes e tubulosas com cores fortes e vibrantes (Mattos, 1970; Santos, 2017). Por contribuir de forma significativa para a riqueza da flora nos Neotrópicos (Gentry, 1988), ter ampla distribuição e importância econômica, pelo menos sete países neotropicais escolheram uma espécie de ipê como sua flor ou árvore símbolo nacional (Gentry, 1992). As espécies de ipês são utilizadas na medicina tradicional e a madeira é amplamente utilizada na carpintaria (Mattos, 1970; Ospina et al., 2013; Santos, 2017). No Brasil, cerca de 40 espécies são conhecidas popularmente como ipês, sendo incluídas em cinco gêneros: *Cybistax* Mart. ex Meisn., *Handroanthus* Mattos, *Jacaranda* Juss., *Tabebuia* Gomes ex DC. e *Tecoma* Juss. (Flora do Brasil, 2020).

A maior parte das espécies conhecidas como ipês estão incluídos na Aliança *Tabebuia*, um dos maiores clados da família Bignoniaceae, com 14 gêneros e cerca de 150 espécies restritas a região Neotropical (Olmstead et al., 2009). Os dois gêneros mais importantes do ponto de vista econômico e florístico são *Handroanthus* e *Tabebuia*, representados principalmente por árvores ou arbustos com folhas compostas e palmadas, flores com cálice espatáceo a cupular e corolas infundibuliformes com variadas cores (Olmstead et al., 2009).

Tabebuia foi originalmente descrito por De Candolle (1838). O conceito genérico do nome *Tabebuia* foi estendido para incluir uma larga diversidade morfológica, resultado de diversas revisões (De Candolle, 1838; Sprague e Sandwith, 1932; Gentry, 1969). Porém, Mattos (1970) descreveu *Handroanthus* baseado em um restrito grupo brasileiro de *Tabebuia*. Depois disso, Gentry (1992) insistiu no amplo delineamento de *Tabebuia* e colocou *Handroanthus* em sua sinonímia. Estudos de filogenia molecular confirmaram *Tabebuia s.l.* como polifilético e dois gêneros nele aninhados, *Roseodendron* e *Handroanthus*, foram reestabelecidos (Grose e Olmstead, 2007).

As madeiras das espécies de ipês estão entre as mais caras do mundo sendo as mais valiosas da região tropical brasileira, e uma das mais apreendidas em carregamentos ilegais de madeira (Greenpeace, 2015). Embora diversas espécies de ipês apresentem grande importância econômica, as madeiras das espécies de *Handroanthus* são as mais apreciadas pela maior densidade e durabilidade, quando comparadas com espécies de *Tabebuia* (Gentry, 1992; Grose e Olmstead 2007). Diferenciar indivíduos dos dois gêneros não é uma tarefa fácil, pois é

necessária a presença de flores e folhas, e tais estruturas são difíceis de ocorrer em um mesmo indivíduo ao mesmo tempo. Por essa razão, a maioria das coletas nos herbários não apresenta uma boa representação de folhas e flores em uma mesma exsicata, indicando que, apesar de serem árvores comuns e abundantes em ambientes nativos e urbanos da região centro-oeste do Brasil, a incompletude das exsicatas aliada ao baixo número de especialistas se refletem em muitos espécimes mal identificados nos herbários (Alves et al., 2018; Gasper et al., 2020). Além do mais, há inúmeras espécies de ipês ameaçadas de extinção e que ao mesmo tempo são exploradas na indústria madeireira (IUCN, 2001).

Sequências de DNA em disponíveis em bibliotecas públicas como o GenBank, podem contribuir para acelerar a identificação de madeiras de carregamentos ilegais (Yu et al., 2017), de espécies ameaçadas de extinção e conseqüentemente, contribuir para a conservação dos ipês (Hartvig et al., 2015). Portanto, há vários motivos importantes para testar marcadores moleculares com o objetivo de identificação de espécies de ipês e contribuir para reconhecimento de um grupo importante para conservação da Flora Neotropical e com inúmeras espécies ameaçadas de extinção.

DNA *Barcoding* é uma ferramenta de identificação molecular de espécies proposta por Hebert et al. (2003). Além da identificação, o DNA *Barcoding* fornece ferramentas úteis em trabalhos de filogenia, evolução molecular, e auxilia no monitoramento do comércio ilegal de espécies (Kang et al., 2017; Yu et al., 2017). Desde que foi proposta até o final do ano de 2018, mais de 3.700 artigos haviam sido publicados usando a técnica (DeSalle e Goldstein, 2019). Por ser um método que não é afetado pelo estágio de desenvolvimento da planta, tem um papel importante no auxílio a taxonomia tradicional (Hebert et al., 2003; Lv et al., 2015). A técnica utiliza marcadores moleculares, que são fragmentos de DNA chamados de *barcodes*. Para ser considerado um bom *barcode*, o marcador deve ter altas taxas de sucesso de amplificação com o uso de *primers* universais, ser curto, com variação que possibilite discriminação a nível de espécie e, preferencialmente, não ter sobreposição entre as distâncias genéticas intra- e interespecíficas (Hebert et al., 2003; Yu et al., 2017).

Na tentativa de unificar e encontrar o melhor *barcode* para plantas, o *Plant Working Group* do *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL, Plant Working Group 2009) elegeu entre os melhores *barcodes* o gene *matK* e o espaçador intergênico *trnH-psbA*, ambos do DNA plastidial. Tais marcadores têm sido utilizados com sucesso. Lahaye et al. (2008), propuseram o *matK* como *barcode* para plantas com flores. Kress et al. (2009), obtiveram 98% de sucesso de identificação de árvores lenhosas, arbustos e palmeiras, utilizando *matK* e *trnH-psbA*. Zuo

et al. (2010), obtiveram sucesso ao testar nove marcadores moleculares, entre eles *matK* e *trnH-psbA*, para identificar as espécies do gênero *Panax*. Castro et al. (2015) obtiveram 99% de sucesso nas análises utilizando *matK*, *trnH-psbA* e outros marcadores. No Brasil, Inglis et al. (2018) identificaram quatro espécies do gênero *Phyllanthus* L. com *matK*, *trnH-psbA* e outros marcadores, e Paranaíba et al. (2019) realizaram um estudo de caso de botânica forense obtiveram 98-100% de identificação de suas amostras.

Os objetivos deste estudo foram: 1) testar a eficiência na identificação de espécies de ipês dos marcadores plastidiais *matK* e *trnH-psbA*, sozinhos e concatenados, 2) criar um banco de dados local de sequências de DNA com os marcadores plastidiais *matK* e *trnH-psbA* para os ipês dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda*, *Handroanthus*, *Tabebuia* e *Tecoma*, e 3) avaliar a representatividade das espécies-alvo no banco de dados público.

2. Material e métodos

2.1 Amostragem

As coletas foram feitas na cidade de Campo Grande, localizada na região central do estado de Mato Grosso do Sul, região Centro Oeste do Brasil. O município está situado sobre a bacia sedimentar do Paraná e pertence aos domínios da região fitogeográfica do Cerrado (PLANURB, 2020). Entre os indivíduos coletados, identificamos cinco gêneros e 12 espécies da família Bignoniaceae conhecidas popularmente como ipês: *Cybistax* (*C. antisyphilitica* (Mart.) Mart.), *Handroanthus* (*H. chrysotrichus* (Mart. Ex DC.) Mattos, *H. heptaphyllus* (Vell.) Mattos, *H. impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos, *H. ochraceus* (Cham.) Mattos, *H. serratifolius* (Vahl) S. Grose), *Jacaranda* (*J. cuspidifolia* Mart.), *Tabebuia* (*T. aurea* (Silva Manso) Benth. and Hook.f. ex S.Moore, *T. pentaphylla* (L.) Hemsl. (exótica), *T. roseoalba* (Ridl.) Sandwith, *T. pallida* (Lindl.) Miers) (exótica) e *Tecoma* (*T. stans* (L.) Juss. ex Kunth) (exótica).

Das espécies abordadas neste estudo, as dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda* e *Tecoma*, são mais fáceis de serem distinguidas. O ipê-verde (*Cybistax antisyphilitica*) apresenta flores verdes, porte médio e tronco com cascas grossas e fendas longitudinais. O ipê-roxo (*Jacaranda cuspidifolia*) possui flores roxas, porte médio e folhas bipinadas. O ipê-de-jardim (*Tecoma stans*) apresenta flores amarelas, floresce o ano inteiro, tem porte pequeno e folhas compostas com margem serreada (Gentry, 1992). O gênero *Tabebuia* é o maior dentro da família (Santos, 2017), representado por arbustos ou árvores, folhas simples, com margem inteira ou serrilhada, flores tubulares, ovário com 3-4 óvulos, fruto capsular e sementes aladas ou não (Gentry, 1992).

O gênero *Handroanthus* apresenta cálice campanulado, tubular, coriáceo, corola infundibuliforme, ovário bilocular com 8-9 óvulos (Mattos, 1970).

Coletamos dois espécimes de *Tabebuia pallida* e cinco espécimes de cada uma das demais 11 espécies, totalizando 57 indivíduos em diferentes locais da área urbana de Campo Grande entre maio a setembro de 2019 (Tabela 1). Coletamos folhas jovens que foram preservadas em sílica gel para a extração do material genético, e material para ser herborizado e depositado no Herbário CGMS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). As espécies coletadas e suas informações principais, estão apresentadas em pranchas (material suplementar).

2.2 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Extraímos o material genético das folhas com base no protocolo de Doyle e Dickson (1987) utilizando o método CTAB. Verificamos a integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose 1% (Promega, Fitchburg, WI, USA) corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) e visualizado em luz ultravioleta.

Utilizamos dois dos marcadores plastidiais recomendados pelo CBOL (CBOL Plant Working Group, 2009): o gene *matK* com os *primers* diretos 3F_KIM F (CBOL, Plant Working Group 2009) e TMatK(F) (Hilu et al., 2003) e reversos 1R_KIM R (CBOL, 2009) e trnK2(R) (Johnson e Soltis, 1995); e o espaçador intergênico *trnH-psbA* com os *primers* diretos psbA3 f (Costion et al., 2011) e psbA (Hamilton, 1999) e reversos trnHf_05 (Costion et al., 2011) e trnH (GUG) (Hamilton, 1999). As amplificações foram realizadas em volume final de 25µl contendo: para *trnH-psbA*: 1X Buffer, 0,2mM de dNTPs, 0,2µM dos iniciadores direto e reverso, 2mM de MgCl₂, 1U GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, WI, USA), cerca de 10 ng de DNA; para *matK*: 1X Buffer, 0,2mM de dNTPs, DMSO 4% do volume total da reação, 1,5mM de MgCl₂, 1µM dos iniciadores direto e reverso, 2U GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, WI, USA) 0,1mg/ml de BSA, cerca de 10 ng de DNA. Os ciclos de PCR foram conduzidos em um termociclador Veriti™ 96-Well, com as seguintes condições: *trnH-psbA* 94°C por 3 minutos; 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) e 72°C por 10 minutos; e para *matK* sendo 94°C por 5 minutos; 38 ciclos (94°C por 40 segundos, 48°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos) e 72°C por 7 minutos. Verificamos os produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a purificação utilizamos o protocolo de Erlich (1989) com as seguintes modificações: adicionamos ao conteúdo da PCR 2µl de acetato de amônia 3M, 40µl de álcool P.A e deixamos *overnight* no

freezer. Em seguida, centrifugamos por 20 minutos a 12.000 rpm e descartamos o sobrenadante com a pipeta. Adicionamos 200µl de álcool 70% gelado, centrifugamos por 5 minutos, descartamos o sobrenadante e deixamos secar a temperatura ambiente. Depois de seco, acrescentamos 20µl de água ultrapura. O sequenciamento foi realizado na Macrogen (Coréia do Sul) e no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) da Universidade Federal de Pernambuco em equipamento 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems™).

2.3 Análises das sequências

A visualização das sequências e construção das sequências consenso foram feitas com o auxílio do programa Geneious® 7.1.3 (Kearse et al., 2012). Para a análise de *Basic Local Alignment Tool*® (BLAST) (Altschul et al., 1990) fizemos as consultas no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com a ferramenta Blastn e o algoritmo megablast. Fizemos os alinhamentos das sequências no programa online MAFFT versão 7 (Kato et al., 2017) usando como parâmetros a matriz de pontuação 200PAM / $k = 2$ e penalidade de abertura de gap 1,53. Utilizamos para as análises, sequências de dois espécimes por espécie coletada (Tabela 1), codificamos as inserções/deleções (*indels*) no programa FastGap versão 1.2 (Borchsenius, 2009).

As análises filogenéticas foram realizadas no servidor online *Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research* – CIPRES (Miller et al., 2010), e estimamos o modelo de substituição nucleotídica pela ferramenta jModelTest2 (Posada, 2008). Para as árvores filogenéticas, utilizamos como grupo externo sequências de *Tectona grandis* L. f. (números de GenBank KJ012800 – *matK* e KJ426963 – *trnH-psbA*). Geramos as árvores filogenéticas pelo método de inferência Bayesiana com a ferramenta MrBayes (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com 1 milhão de gerações, salvando os parâmetros e as árvores a cada mil gerações. Verificamos o tamanho efetivo amostral (ESS) >200 e a convergência usando o programa Tracer v1.6.2 (Rambaut et al., 2018). Descartamos 25% das árvores iniciais geradas e editamos as árvores finais no programa FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2009).

Para calcular as distâncias genéticas dos gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia* foram utilizadas as sequências geradas neste trabalho (concatenadas e codificadas), com o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P). Geramos as matrizes de distância com o software PAUP (Swofford, 2003) e então calculamos a média, o desvio padrão e os valores máximos e mínimos das distâncias interespecíficas e intraespecíficas. Além disso, para os gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia*, usamos a ferramenta *Automatic Barcode Gap Definition* – ABGD (Puillandre et al.,

2011) com os marcadores concatenados e codificados, para avaliarmos o *barcode gap* das distribuições das distâncias par-a-par, com as configurações: $P_{min} = 0,001$, $P_{max} = 0,1$, diferentes valores de largura da lacuna X (de 0,5 a 1,5), Nb bins = 20 e modelo de substituição K2P.

3. Resultados

3.1 Banco de dados

Amplificamos todas as amostras (24) com os marcadores *trnH-psbA* e *matK* (Tabela 1) e geramos o total de 41 sequências, sendo 21 para o marcador *trnH-psbA* e 20 para *matK* (Tabelas 2 e 3). O alinhamento das sequências do marcador *matK* ficou com 773 pares de base (85 sítios variáveis) e do *trnH-psbA* com 444 pares de base sem a codificação dos *indels* (142 sítios variáveis). O alinhamento com os marcadores concatenados ficou com 1217 pares de base (Tabela 4). As sequências obtidas a partir de espécimes considerados coespecíficos, corroboraram a identificação morfológica apresentando sequências iguais ou com baixíssima divergência (de 0 até 7% de divergência).

Na maioria dos casos, os resultados das buscas feitas no BLAST não se mostraram eficientes para a identificação das espécies ou dos gêneros (Tabelas 2 e 3). Para as 12 espécies abordadas neste estudo, quatro tiveram a identificação correta com o marcador *matK* (considerando o resultado dos cinco primeiros *hits*), são elas: *Cybistax antisiphilitica*, *Handroanthus ochraceus*, *Tabebuia aurea* e *Tecoma stans*. Com o marcador *trnH-psbA* também foram quatro identificações corretas (considerando o resultado dos cinco primeiros *hits*): *Handroanthus ochraceus*, *Jacaranda cuspidifolia*, *Tabebuia aurea* e *Tecoma stans*. Entretanto, quando considerado a identificação realizada apenas no primeiro *hit*, a porcentagem de identificação ficou entre 8,33 e 18,66% (Tabela 4).

3.2 Árvores filogenéticas e distâncias genéticas

Com base no número de agrupamentos monofiléticos recuperados nas reconstruções das árvores (Figuras 1, 2 e 3), alcançamos 100% de identificação no nível de gênero com os dois marcadores separados e concatenados. No nível de espécie, a identificação ficou em 75% com o marcador *trnH-psbA* e com os marcadores concatenados (*trnH-psbA* + *matK*), ao passo que com o *matK*, a identificação alcançou 55,5% (Tabela 4).

Os valores de distâncias genéticas foram calculados apenas para os gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia*, pois somente eles apresentavam mais de uma espécie abordada neste

estudo. Não houve sobreposição dos valores intraespecíficos e interespecíficos das distâncias genéticas em nem um dos marcadores com nem uma espécie. A média das distâncias intraespecíficas dos gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia*, foi de 0,0090 e 0,0212, respectivamente. O valor máximo das distâncias intraespecíficas de *Handroanthus* e *Tabebuia*, foi 0,0168 e 0,0332, respectivamente (Tabelas 5 e 6).

3.3 Barcode Gap

As análises de *Barcode gap* (ABGD) foram feitas apenas para *Handroanthus* e *Tabebuia*, que apresentavam mais de uma espécie. As análises resultaram em agrupamentos semelhantes ao dos agrupamentos formados nas árvores de inferência bayesiana. O gênero *Handroanthus* (cinco espécies, nove amostras), resultou na formação de quatro grupos, são eles: grupo 1 com a amostra de *Handroanthus chrysotrichus*, grupo 2 com as duas amostras de *H. impetiginosus* e de *H. heptaphyllus*, grupo 3 com as amostras de *H. serratifolius* e grupo 4 com as amostras de *H. ochraceus*. O gênero *Tabebuia* (quatro espécies, cinco amostras), resultou na formação de 3 grupos: grupo 1 com as únicas amostras de *Tabebuia aurea* e *T. pallida*, grupo 2 com as duas amostras de *T. pentaphylla* e grupo 3 com a amostra de *T. roseoalba*.

4. Discussão

Nossos resultados indicaram o *trnH-psbA* como melhor *barcode* para identificação das espécies de ipês com 75% de acerto, considerando também o sucesso no processo de amplificação e sequenciamento para este marcador. Por essa razão, o marcador tem sido utilizado por diversos autores para identificar espécies (Kress e Erickson, 2007; Shaw et al., 2007; Dong et al., 2012; Castro et al., 2015; Inglis et al., 2018; Paranaíba et al., 2019), bem como tem sido selecionado como melhor *barcode* locus-único para plantas com flores (Kress et al., 2005). Apesar das árvores filogenéticas produzidas com os dados dos dois marcadores concatenados (Figura 1) apresentarem melhores valores de sustentação dos ramos, o percentual de identificação foi o mesmo com o marcador *trnH-psbA*, 75% (Tabela 4). Portanto, a utilização dos marcadores em conjunto melhorou o suporte de sustentação dos ramos, mas não aumentou o percentual de identificação das espécies. A utilização de marcadores concatenados foge da premissa de que um bom *barcode* precisa ser de sequência curta (Hebert et al., 2003; Yu et al., 2017). Portanto, o marcador *trnH-psbA* apresentou um custo-benefício maior que o marcador *matK* e que os dois marcadores concatenados. Embora o *trnH-psbA* apresente alinhamento

ambíguo, causado por altas taxas de inserções e deleções, o marcador é a região mais variável não codificante do genoma plastidial em angiospermas (Kress et al., 2005; Shaw et al., 2007; Heinze et al., 2014). Outra vantagem do *trnH-psbA* é que, pela sua dupla aplicabilidade (filogenia e DNA *barcoding*), o marcador possui mais de 35 mil sequências disponíveis no GenBank.

O *matK* é indicado como *barcode* pelo alto poder de discriminar espécies, facilidade em amplificação e aplicabilidade em outras áreas da ciência (Kress e Erickson, 2007). Este foi o *barcode* locus-único indicado por Lahaye et al. (2008) para plantas com flores, um dos marcadores selecionados pelo CBOL (2009) e recomendado em conjunto com outros marcadores por diversos autores (Shaw et al., 2007; Dong et al., 2012; Castro et al., 2015; Inglis et al., 2018; Paranaíba et al., 2019).

Embora o *rbcL* tenha sido proposto como um *barcode* padrão em conjunto com o *trnH-psbA* e o *matK* (Chase et al., 2007; CBOL Plant Working Group 2009), o marcador tem menor sucesso de amplificação (Kress et al., 2009; Kress et al., 2010), menor taxa de identificação de espécies (Kress e Erikson, 2007) e não aumenta a porcentagem de identificação quando associado em um multilocus com o *trnH-psbA* e o *matk* (Chase et al., 2005; Kress e Erickson 2007; Parmentier et al., 2013). Portanto, a opção *trnH-psbA* + *matk* foi a melhor combinação de barcodes indicado por diversos autores (Lahaye et al., 2008; Parmentier et al. 2013).

Os dois principais gêneros que incluem espécies conhecidas popularmente como ipês, *Handroanthus* e *Tabebuia*, que representam 75% das espécies abordadas neste estudo, apresentam um histórico de classificação complexo (Gentry, 1969; Gentry, 1992; Santos, 2017). Tal confusão, exprime a ideia de que as relações filogenéticas desses dois gêneros ainda estão correlacionadas, sugerindo um processo de diversificação recente, resultando em uma menor eficiência da técnica do DNA *barcoding* para todas as espécies (Hartvig et al., 2015). Em nossas análises exploratórias e finais (Figuras 1, 2 e 3), pudemos perceber isso de forma explícita. Enquanto *Cybistax*, *Jacaranda* e *Tecoma* separaram entre si logo nas primeiras rodadas de análises, *Handroanthus* e *Tabebuia* requereram mais esforços para esclarecer as relações, como por exemplo a codificação de *indels* e a conferência de espécimes (que foram feitos para os cinco gêneros). Na árvore filogenética com marcadores concatenados (Figura 1), o suporte de sustentação do ramo entre *Handroanthus* e *Tabebuia* foi baixo (0,7696).

Os espécimes de *Handroanthus impetiginosus* se agruparam com os de *H. heptaphyllus*, enquanto as amostras de *H. ochraceus* se aninharam com *H. chrysotrichus* (Figura 1). Segundo Gentry (1992), *H. chrysotrichus* pode facilmente ser considerada uma variedade *H. ochraceus*,

enquanto para Fabris (1993) *H. heptaphyllus* deve ser incorporada a *H. impetiginosus*. Se os quatro nomes forem considerados apenas duas espécies, as porcentagens de identificação encontradas aqui alcançam 100% com o *trnH-psbA* e com os marcadores concatenados.

A porcentagem de identificação de espécies pelas análises de BLAST foi baixa (Tabela 4). Este fato é explicado pela ausência de sequências dos táxons analisados neste estudo, no GenBank, à baixa variação genética dos marcadores (e conseqüente falta de resolução filogenética, especialmente se analisados separadamente), a erros de identificação dos espécimes e desatualização da nomenclatura das sequências disponíveis no GenBank (Parmentier et al., 2013). Assim como para os resultados de Ghorbani et al. (2017), a taxa de identificação pelas análises de BLAST, dependeu da disponibilidade de sequências de referência nos bancos públicos. As identificações a nível de família foram 100% corretas.

Nossos resultados foram muito melhores (mais resolutivos geneticamente), quando comparamos nossas amostras com nosso banco de dados local (análises de inferência bayesiana e ABGD), que quando comparamos com o banco de dados público (análises de BLAST e análises exploratórias). Isso deve-se ao fato de que o nosso banco de dados local contemplou todas as espécies amostradas neste estudo (Ghorbani et al., 2017). No banco de dados público, seis das 12 espécies que trabalhamos não tinham sequências disponíveis para qualquer marcador no GenBank. Apesar do banco de dados local ser abrangente no número de espécies, ele não consegue ser abrangente na diversidade de haplótipos dentro das espécies, pois a amostra testada pode ter um haplótipo diferente dos indivíduos coespecíficos representado em tal banco (Parmentier et al., 2013).

5. Conclusão

Em conclusão, recomendamos o marcador plastidial *trnH-psbA* para a identificação das 12 espécies de ipês encontrados na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Ressaltamos a importância deste estudo na melhoria e aumento do banco de dados público de DNA e também na direção do entendimento das relações filogenéticas do grupo em questão.

Declaração de interesse

Nenhum.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado por Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): Código Financeiro 001 (bolsa de mestrado da PG, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, UFMS, Brasil).

Referências

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Alves, F.M., Lehn, C.R. Damasceno-Júnior, G.A., Sartori, Â.L.B., Pott, A., Potti, V.J., Bortolotto, I.M., Ishii, I.H., Salis, S.M., Urbanetz, C., Bueno, M.L., Sciamarelli, A. 2018. Coleções Botânicas do estado de Mato Grosso do Sul: situação atual e perspectivas. *Iheringia Sér. Bot.* 73, 93–100.
- Borchsenius, F. 2009. FastGap 1.2. Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark. Published online at <http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm>.
- Castro, C., Hernandez, A., Alvarado, L., Flores, D. 2015. DNA Barcodes in Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) Using ITS Regions of Ribosomal DNA, the *psbA-trnH* Spacer and the *matK* Coding Sequence. *Am. J. Plant Sci.* 6, 95–102.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 12794–12797.
- Chase, M., Cowan, R., Hollingsworth, P., Van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Wilkinson, M. 2007. A Proposal for a Standardised Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon* 56, 295-299.
- Costion, C., Ford, A., Cross, H., Crayn, D., Harrington, M., Lowe, A. 2011. Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. *Plos One* 6, e26841.
- De Candolle, A.P. 1838. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Treuttel and Würtz, Paris 6, 687.
- DeSalle, R., Goldstein, P. 2019. Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Front. Ecol. Evol.* 7, 302.

- Dong, W.P., Liu, J., Yu, J., Wang, L., Zhou, S.L. 2012. Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *Plos One* 7, e35071.
- Doyle, J.J., Dickson, E.E. 1987. Preservation of Plant Samples For DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Taxon* 36, 715–722.
- Erlich, H.A. 1989. PCR technology. Stockton Press.
- Fabris, H. A. 1993. Bignoniaceae, en A. L. Cabrera (ed.), Flora de la Provincia de Jujuy. Colecc. Ci Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. 13(9): 226-262.
- Flora do Brasil. 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB114027>>. Acesso em: 29 Mar. 2019.
- Gasper, A.L., Stehmann, J.R., Roque, N., Bigio, N.C., Sartori, A.L.B., Grittz, G.S. 2020. Brazilian herbaria: an overview. *Acta Bot. Bras.* 34, 352–359.
- Gentry, A.H. 1969. *Tabebuia*: the tortuous history of a generic name (Bignon.). *Taxon* 18, 635–642.
- Gentry, A.H. 1988. Changes in Plant Community Diversity and Floristic Composition on Environmental and Geographical Gradients. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75, 1-34.
- Gentry, A.H. 1992. Bignoniaceae: Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotrop.* 25, 1-370.
- Ghorbani, A., Saeedi, Y., Boer, H.J. 2017. Unidentifiable by morphology: DNA barcoding of plant material in local markets in Iran. *Plos One* 12, e0175722.
- Greenpeace. 2015. A Crise Silenciosa da Amazônia Licença para Lavar madeira: Garantida. Relatório Junho de 2015. Disponível em <<https://www.greenpeace.org/brasil/>>.
- Grose, S.O., Olmstead, R.G. 2007. Taxonomic Revisions in the Polyphyletic Genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). *Syst. Bot.* 32, 660–670.
- Hamilton, M.B. 1999. Primer Notes: Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.* 8, 513–525.
- Hartvig, I., Czako, M., Kjær, E.D., Nielsen, L.R., Theilade, I. 2015. The Use of DNA Barcoding in Identification and Conservation of Rosewood (*Dalbergia* spp.). *Plos One* 10, e0138231.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270, 313–321.
- Heinze, B., Koziel-Monte, A., Jahn, D. 2014. Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols. Pascale Besse, 85-120.
- Hilu, K.W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T.A., Rohwer, J.G.,

- Campbell, C.S., Chatrou, L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *Am. J. Bot.* 90, 1758–1776.
- Inglis, P.W., Mata, L.R., da Silva, M.J., Vieira, R.F., Alves, R.B.N., Silva, D.B., Azevedo, V.C.R. 2018. DNA Barcoding for the Identification of *Phyllanthus* Taxa Used Medicinally in Brazil. *Planta Med.* 84, 1300–1310.
- IUCN. (2001). IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission.
- Jhonson L.A., Soltis D.E. 1995. Phylogenetic Inference in Saxifragaceae Sensu Stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) Using *matK* Sequences. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82, 149-175.
- Kang, Y., Deng, Z., Zang, R., Long, W. 2017. DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. *Sci. Rep.* 7, 12564.
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20, 1160–1166.
- Kearse, M., Moir, M., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649.
- Kress, W.J., Erickson, D.L. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *Plos One* 2, e508.
- Kress, W.J., Erickson, D.L., Jones, F.A. Swenson, N.G., Perez, R., Sanjur, O., Bermingham, E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *PNAS* 106, 18621–18626.
- Kress, W.J., Erickson, D.L., Swenson, G., Thompson, J., Uriarte, M., Zimmerman, J.K. 2010. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamic plot. *PLoS One* 5, e15409.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 8369-8374.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. and Evol.* 35, 1547–1549.

- Lahaye, R., Van Der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *PNAS* 105, 2923–2928.
- Ly, T., Teng, R., Shao, Q., Wang, H., Zhang, W., Li, M., Zhang, L. 2015. DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants. *Planta* 242, 1167–1174.
- Mattos, J.R. 1970. *Handroanthus*, um novo gênero para os "ipês" do Brasil. *Loefgrenia*, 50.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop 1–8.
- Olmstead, R.G., Zjhra, M.L., Lohmann, L.G., Grose, S.O., Eckert, A.J. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *Am. J. Bot.* 96, 1731–1743.
- Ospina, L.A.F., Guerrero, J.P.C., Buendía, Y.C.O., Bolívar, I.B.P., Castillo, F.D. 2013. Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Rev. Cub. de Plant. Med.* 18, 34–46.
- Paranaíba, R.T.F., Carvalho, C.B.V., Freitas, J.M., Fassio, L.H., Botelho, É.D., Neves, D.B.J., Silva Jr, R.C., Aguir, S.M. 2019. Forensic botany and forensic chemistry working together: application of plant DNA barcoding as a complement to forensic chemistry - a case study in Brazil. *Genome* 62, 11–18.
- Parmentier, I., Duminil, J., Kuzmina, M., et al. 2013. How Effective Are DNA Barcodes in the Identification of African Rainforest Trees? *Plos One* 8, e54921.
- PLANURB, Agência Municipal de Meio Ambiente e Planejamento Urbano. 2020. Perfil Socioeconômico de Campo Grande/Agência Municipal de Meio Ambiente e Planejamento Urbano 27.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. and Evol.* 25, 1253–6.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G. 2011 ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21, 1864–1877.
- Rambaut, A. 2009. FigTree version 1.3.1. <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A. 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67, 901–904.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Santos, S.R. 2017. A atual classificação do antigo gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae), sob o ponto de vista da anatomia da madeira. *Balduinia* 58, 10–24.

- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. *Amer. J. Bot.* 94, 275–288.
- Sprague, T.A., Sandwith, NY. 1932. Contributions to the Flora of Tropical America: IX. *Bull. Misc. Inform. Kew.* 1, 18–28.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Yu, M., Jiao, L., Guo, J., Wiedenhoef, A.C., He, T., Jiang, X., Yin, Y. 2017. DNA barcoding of vouchered xylarium wood specimens of nine endangered *Dalbergia* species. *Planta* 246, 1165–1176.
- Zuo, Y., Chen, Z., Kondo, K., Funamoto, T., Wen, J., Zhou, S. 2010. DNA Barcoding of *Panax* Species. *Planta Med.* 77, 182–187.

Material suplementar

Informações adicionais podem ser encontradas online na guia de informações de suporte deste artigo.

Material suplementar: pranchas com detalhes de descrição taxonômica, distribuição, locais de amostragem, informações de espécimes e chaves de identificação utilizadas para a identificação morfológica de espécimes de “ipês” urbanos (Bignoniaceae) utilizados neste estudo.

Legendas das figuras

Fig. 1. Árvore de inferência bayesiana de espécies de ipês dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda*, *Handroanthus*, *Tabebuia* e *Tecoma* utilizando os marcadores *matK* e *psbA-trnH*, com as sequências geradas neste trabalho.

Fig. 2. Árvore de inferência bayesiana de espécies de ipês dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda*, *Handroanthus*, *Tabebuia* e *Tecoma* utilizando o marcador *matK* com as sequências geradas neste trabalho.

Fig. 3. Árvore de inferência bayesiana de espécies de ipês dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda*, *Handroanthus*, *Tabebuia* e *Tecoma* utilizando o marcador *psbA-trnH*, com as sequências geradas neste trabalho.

Tabela 1. Relação das espécies coletadas com seus espécimes, código de acesso a sequência de DNA no GenBank, código no herbário CGMS e a coordenada em que a amostra foi coletada.

Espécie	Espécime	Código GenBank	Voucher*	Primer**
<i>Cybistax antisiphilitica</i>	Cybistax 3		CGMS 75777	1 (1)
<i>Cybistax antisiphilitica</i>	Cybistax 4		CGMS 75778	1 (2)
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	H_chrysotrichus 2		PGS 17	2 (1)
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	H_chrysotrichus 4		PGS 34	2 (1)
<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	H_heptaphyllus 2		PGS 18	1 (1)
<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	H_heptaphyllus 4		PGS 25	1 (1)
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	H_impetiginosus 3		CGMS 75782	1 (2)
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	H_impetiginosus 4		CGMS 75783	1 (2)
<i>Handroanthus ochraceus</i>	H_ochraceus 1		PGS 35	1 (1)
<i>Handroanthus ochraceus</i>	H_ochraceus 3		PGS 37	1 (1)
<i>Handroanthus serratifolius</i>	H_serratifolius 1		PGS 38	1 (1)
<i>Handroanthus serratifolius</i>	H_serratifolius 5		PGS 51	1 (1)
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	J_cuspidifolia 1		PGS 22	2 (1)
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	J_cuspidifolia 3		PGS 33	1 (1)
<i>Tabebuia aurea</i>	T_aurea 1		PGS 20	1 (1)
<i>Tabebuia pallida</i>	T_pallida 1		PGS 52	1 (1)
<i>Tabebuia pallida</i>	T_pallida 2		PGS 53	2 (2)
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	T_pentaphylla 1		PGS 11	2 (1)
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	T_pentaphylla 3		PGS 26	1 (1)
<i>Tabebuia roseoalba</i>	T_roseoalba 2		PGS 56	2 (1)
<i>Tabebuia roseoalba</i>	T_roseoalba 4		PGS 54	1 (1)
<i>Tecoma stans</i>	Tecoma 2		PGS 29	1 (1)
<i>Tecoma stans</i>	Tecoma 3		PGS 31	1 (1)

*Espécimes depositados no herbário CGMS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (MS), Brasil. ***Primers* utilizados na PCR e no sequenciamento: *psbA-trnH (matK)*. 1 *psbA-trnH* = par de *primer* *psbA3 f* e *trnHf_05*. 2 *psbA-trnH* = *psbA* e *trnH* (GUG). 1 *matK* = 3F_KIM F e 1R_KIM R. 2 *matK* = TMatK(F) e trnK2(R).

Tabela 2. Resultado do BLAST para o marcador *trnH-psbA* para as 12 espécies urbanas de ipê em Campo Grande, com os cinco primeiros *hits* usando o E-value como referência e a porcentagem e identidade.

Espécie	Espécime	Identificação no GenBank (nº de acesso)	% identidade
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	Cybistax_3	<i>Godmania aesculifolia</i> (HG963800) <i>Radermachera microcalyx</i> (KR533838, KR533837, KR533836) <i>Tabebuia rosea</i> (JX856963)	91,04% a 87,39%
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	Cybistax_4	<i>Godmania aesculifolia</i> (HG963800) <i>Radermachera microcalyx</i> (KR533838, KR533837, KR533836) <i>Tabebuia rosea</i> (JX856963)	91,04% a 87,39%
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	H_chrysotrichus_2	<i>Tabebuia guayacan</i> (GQ98237) Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972) <i>Tabebuia chrysantha</i> (HG963560), <i>Tabebuia rosea</i> (JX856962), <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652)	96,95% a 95,67%
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	H_impetiginosus_3	<i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Crescentia cujete</i> (KJ426683) <i>Amphitecna latifolia</i> (KJ426602) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652) Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972)	98,33% a 97,03%
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	H_impetiginosus_4	<i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Crescentia cujete</i> (KJ426683) <i>Amphitecna latifolia</i> (KJ426602) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652) Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972)	98,34% a 96,03%

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Espécime	Identificação no GenBank (nº de acesso)	% identidade
<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	H_heptaphyllus_2	<i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Crescentia cujete</i> (KJ426683) <i>Amphitecna latifolia</i> (KJ426602) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652) Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972)	98,34% a 96,03%
<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	H_heptaphyllus_4	<i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Crescentia cujete</i> (KJ426683) <i>Amphitecna latifolia</i> (KJ426602) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652) Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972)	98,34% a 96,03%
<i>Handroanthus ochraceus</i>	H_ochraceus_1	Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972) <i>Tabebuia chrysantha</i> (HG963560) <i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Tabebuia rosea</i> (JX856962) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652)	97,26% a 95,97%
<i>Handroanthus ochraceus</i>	H_ochraceus_3	Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972) <i>Tabebuia chrysantha</i> (HG963560) <i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Tabebuia rosea</i> (JX856962) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652)	96,93% a 95,95%
<i>Handroanthus serratifolius</i>	H_serratifolius_1	<i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652) <i>Crescentia cujete</i> (KJ426683) <i>Amphitecna latifolia</i> (KJ426602) Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972)	97,69% a 96,04%

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Espécime	Identificação no GenBank (nº de acesso)	% identidade
<i>Handroanthus serratifolius</i>	H_serratifolius_5	<i>Tabebuia guayacan</i> (GQ982377) <i>Handroanthus ochraceus</i> (HG963652) <i>Crescentia cujete</i> (KJ426683) <i>Amphitecna latifolia</i> (KJ426602) Magnoliophyta – amostra ambiental (LN898972)	97,39% a 95,47%
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	J_cuspidifolia_1	<i>Jacaranda mimosifolia</i> (JX856901) <i>Jacaranda cuspidifolia</i> (JX856900) <i>Jacaranda puberula</i> (KF421097) <i>Jacaranda</i> sp. (JN661808) <i>Digomphia laurifolia</i> (MF786111)	99,37% a 95,68%
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	J_cuspidifolia_3	<i>Jacaranda mimosifolia</i> (JX856901) <i>Jacaranda cuspidifolia</i> (JX856900) <i>Jacaranda puberula</i> (KF421097) <i>Digomphia laurifolia</i> (MF786111) <i>Jacaranda puberula</i> (KF421098)	93,69% a 90,29%
<i>Tabebuia aurea</i>	T_aurea_1	<i>Handroanthus aureus</i> (MH622118, JX856960, JX856958, KM054215, KM054445)	100% a 99,15%
<i>Tabebuia pallida</i>	T_pallida_1	<i>Tabebuia heterophylla</i> (HM447007, MH622119) <i>Tabebuia schumanniana</i> (KJ426959, KJ426961, KJ426960)	100% a 97,77%
<i>Tabebuia pallida</i>	T_pallida_2	<i>Tabebuia heterophylla</i> (HM447007, MH622119), <i>Tabebuia schumanniana</i> (KJ426959, KJ426961, KJ426960)	97,59% a 95,37%
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	T_pentaphylla_1	Magnoliophyta – amostra ambiental (LN899139, LN899158) <i>Simarouba amara</i> (GQ982359) <i>Tabebuia rosea</i> (HG963662, JX856963)	100% a 96,81%

Tabela 2. Continuação.

Espécie	Espécime	Identificação no GenBank (nº de acesso)	% identidade
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	T_pentaphylla_3	Magnoliophyta – amostra ambiental (LN899139, LN899158), <i>Simarouba amara</i> (GQ982359), <i>Tabebuia rosea</i> (HG963662, JX856963)	100% a 96,81%
<i>Tabebuia roseoalba</i>	T_roseoalba_4	<i>Handroanthus aureus</i> (MH622118, JX856960, KM054215, JX856958, KM054445)	88,86% a 87,70%
<i>Tecoma stans</i>	Tecoma_2	Magnoliophyta – amostra ambiental (LN899144, LN899143, LN898974) <i>Tecoma stans</i> (HG963507) <i>Radermachera microcalyx</i> (KR533838)	99,04% a 89,78%
<i>Tecoma stans</i>	Tecoma_3	Magnoliophyta – amostra ambiental (LN899144, LN899143, LN898974) <i>Tecoma stans</i> (HG963507) <i>Radermachera microcalyx</i> (KR533838)	99,04% a 89,78%

Tabela 3. Resultado do BLAST para o marcador *matK* para as 12 espécies urbanas de ipê em Campo Grande, com os cinco primeiros *hits* usando o E-value como referência e a porcentagem e identidade.

Espécie	Espécime	Identificação no GenBank (nº de acesso)	% identidade
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	Cybistax_3	<i>Godmania aesculifolia</i> (JQ587017, JQ587016, JQ587015) <i>Cybistax antisyphilitica</i> (MG833463) <i>Zeyheria tuberculosa</i> (MG719041)	99,19% a 98,15%
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	Cybistax_4	<i>Godmania aesculifolia</i> (JQ587017, JQ587016, JQ587015) <i>Cybistax antisyphilitica</i> (MG833463) <i>Zeyheria tuberculosa</i> (MG719041)	99,32% a 98,28%
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	H_chrysotrichus_2	<i>Handroanthus ochraceus</i> (MG718891) <i>Handroanthus umbellatus</i> (MG719027) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032)	96,95% a 95,67%
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	H_impetiginosus_3	<i>Handroanthus albus</i> (KF981308) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032, JQ587035)	98,70% a 98,31%
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	H_impetiginosus_4	<i>Handroanthus albus</i> (KF981308) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032, JQ587035)	99,61% a 99,22%
<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	H_heptaphyllus_2	<i>Handroanthus albus</i> (KF981308) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032, JQ587035)	99,74% a 99,48%
<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	H_heptaphyllus_4	<i>Handroanthus albus</i> (KF981308) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032, JQ587035)	99,48% a 99,09%
<i>Handroanthus ochraceus</i>	H_ochraceus_1	<i>Handroanthus umbellatus</i> (MG719027) <i>Handroanthus ochraceus</i> (MG718891) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032)	100% a 99,58%
<i>Handroanthus serratifolius</i>	H_serratifolius_1	<i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032, JQ587035, JQ587034)	99,61% a 99,48%

Tabela 3. Continuação.

Espécie	Espécime	Identificação no GenBank (nº de acesso)	% identidade
<i>Handroanthus serratifolius</i>	H_serratifolius_5	<i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032, JQ587035, JQ587034)	99,61% a 99,48%
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	J_cuspidifolia_1	<i>Jacaranda mimosifolia</i> (JX518220, MN450152, AJ429328) <i>Jacaranda micrantha</i> (MG718974) <i>Jacaranda puberula</i> (MG718684)	99,09% a 98,67%
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	J_cuspidifolia_3	<i>Jacaranda mimosifolia</i> (JX518220, MN450152, AJ429328) <i>Jacaranda micrantha</i> (MG718974) <i>Jacaranda puberula</i> (MG718684)	99,09% a 98,67%
<i>Tabebuia aurea</i>	T_aurea_1	<i>Handroanthus aureus</i> (MH621560) <i>Tabebuia heterophylla</i> (HQ384521, MH621562.) <i>Tabebuia palustris</i> (JQ587052) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039)	100% a 98,83%
<i>Tabebuia pallida</i>	T_pallida_1	<i>Tabebuia heterophylla</i> (HQ384521, MH621562) <i>Tabebuia palustris</i> (JQ587052) <i>Tabebuia karsoana</i> (KJ012794) <i>Handroanthus aureus</i> (MH621560)	100% a 99,58%
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	T_pentaphylla_1	<i>Tabebuia rosea</i> (JQ587058, JQ587055) <i>Tabebuia heterophylla</i> (MH621562) <i>Tabebuia schumanniana</i> (KJ012798) <i>Tabebuia rigida</i> (KJ012795)	100% a 99,84%
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	T_pentaphylla_3	<i>Tabebuia rosea</i> (JQ587058, JQ587055) <i>Tabebuia heterophylla</i> (MH621562) <i>Tabebuia rigida</i> (KJ012795) <i>Tabebuia karsoana</i> (KJ012794)	99,85% a 99,55%
<i>Tabebuia roseoalba</i>	T_roseoalba_3	<i>Tabebuia heterophylla</i> (HQ384521) <i>Tabebuia palustris</i> (JQ587052) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039, JQ587031, JQ587032)	99,74% a 89,96%

Tabela 3. Continuação.

Espécie	Espécime	Identificação no GenBank (nº de acesso)	% identidade
<i>Tabebuia roseoalba</i>	T_roseoalba_4	<i>Tabebuia heterophylla</i> (HQ384521, MH621562) <i>Tabebuia palustris</i> (JQ587052) <i>Handroanthus aureus</i> (MH621560) <i>Tabebuia guayacan</i> (JQ587039)	99,61% a 98,83%
<i>Tecoma stans</i>	Tecoma_2	<i>Tecoma stans</i> (HQ384522, JX495765, JX517475) <i>Eccremocarpus scaber</i> (HQ384523) <i>Tabebuia heterophylla</i> (HQ384521)	99,35% a 96,23%
<i>Tecoma stans</i>	Tecoma_3	<i>Tecoma stans</i> (HQ384522, JX495765, JX517475) <i>Eccremocarpus scaber</i> (HQ384523) <i>Tabebuia heterophylla</i> (HQ384521)	99,35% a 96,23%

Tabela 4. Visão geral dos resultados das identificações por inferência bayesiana e por BLAST com os marcadores separados e concatenados. A porcentagem de identificação refere-se à proporção de espécies monofiléticas recuperadas com diferentes conjuntos de dados.

Conjuntos de dados	Gêneros	Espécies	Espécies pareadas	Sequências		% de identificação		
				Bases (pb)*	Alinhamento (pb)	Gênero	Espécie	BLAST**
<i>psbA-trnH</i>	5	12	9	372-522	444	100%	75%	8,33%
<i>matK</i>	5	12	9	616-878	773	100%	55,5%	18,66%
<i>psbA-trnH + matK</i>	5	12	8	1042-1709	1217	100%	75%	—

*Pares de base com as sequências de DNA brutas. **Consideramos identificação correta o resultado do primeiro *hit*.

Tabela 5. Valores das distâncias genéticas (média, desvio padrão e valores máximo e mínimo) para o gênero *Handroanthus* com os marcadores concatenados e codificados com as sequências geradas neste estudo.

Gênero	Espécie	N° ind	Intra média	Intra DP	Intra máx	Intra mín	Inter média	Inter DP	Inter máx	Inter mín
<i>Handroanthus</i>			0,0091	0,0045	0,0168	0,0009				
	<i>H.</i>									
<i>Handroanthus</i>	<i>chrysotrichus</i>	1	-	-	-	-	0,0130	0,0043	0,0168	0,0059
	<i>H.</i>									
<i>Handroanthus</i>	<i>impetiginosus</i>	2	0,0009	-	-	-	0,0090	0,0048	0,0160	0,0009
	<i>H.</i>									
<i>Handroanthus</i>	<i>heptaphyllus</i>	2	0,0037	-	-	-	0,0091	0,0049	0,0168	0,0009
<i>Handroanthus</i>	<i>H. ochraceus</i>	2	0,0010	-	-	-	0,0095	0,0018	0,0121	0,0059
	<i>H.</i>									
<i>Handroanthus</i>	<i>serratifolius</i>	2	0,0009	-	-	-	0,0112	0,0016	0,0140	0,0088

Tabela 6. Valores das distâncias genéticas (média, desvio padrão e valores máximo e mínimo) para o gênero *Tabebuia* com os marcadores concatenados e codificados com as sequências geradas neste estudo.

Gênero	Espécie	N° ind	Intra média	Intra DP	Intra máx	Intra mín	Inter média	Inter DP	Inter máx	Inter mín
<i>Tabebuia</i>			0,0212	0,0092	0,0332	0,0000	-	-	-	-
<i>Tabebuia</i>	<i>T. aurea</i>	1	-	-	-	-	0,0194	0,0014	0,0209	0,0177
<i>Tabebuia</i>	<i>T. pallida</i>	1	-	-	-	-	0,0220	0,0040	0,0274	0,0177
<i>Tabebuia</i>	<i>T. pentaphylla</i>	2	0,0000	-	-	-	0,0244	0,0063	0,0332	0,0189
<i>Tabebuia</i>	<i>T. roseoalba</i>	1	-	-	-	-	0,0283	0,0055	0,0332	0,0332

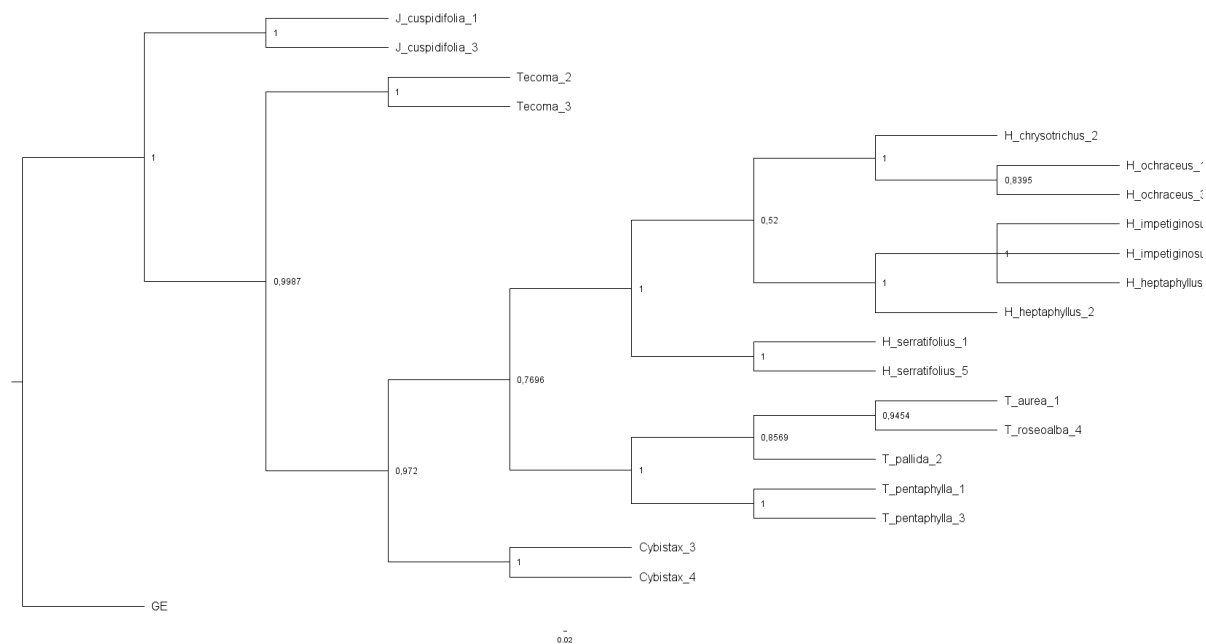


Fig. 1. Árvore de inferência bayesiana de espécies de ipês dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda*, *Handroanthus*, *Tabebuia* e *Tecoma* utilizando os marcadores *matK* e *psbA-trnH*, com as sequências geradas neste trabalho.

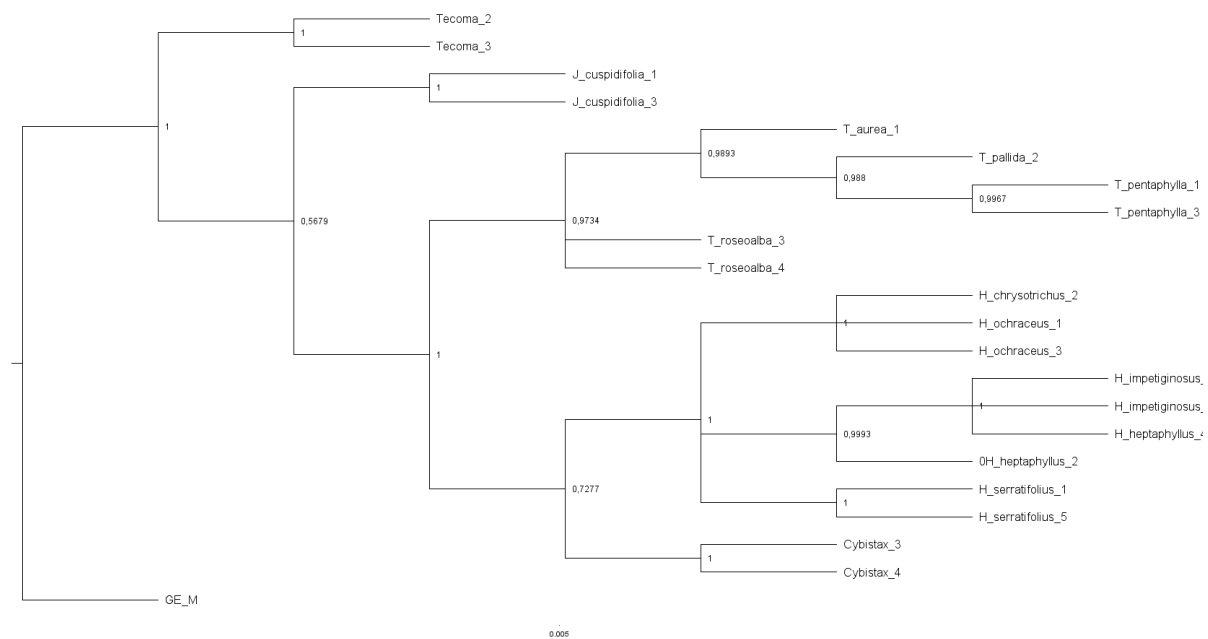


Fig. 2. Árvore de inferência bayesiana de espécies de ipês dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda*, *Handroanthus*, *Tabebuia* e *Tecoma* utilizando o marcador *matK* com as sequências geradas neste trabalho.

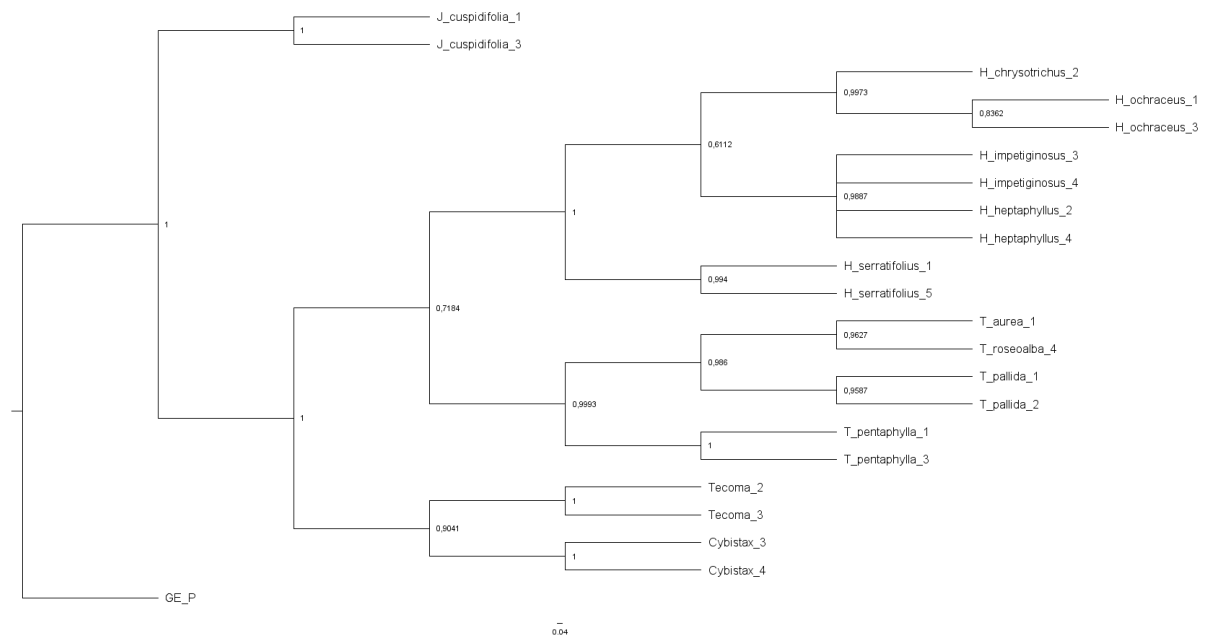


Fig. 3. Árvore de inferência bayesiana de espécies de ipês dos gêneros *Cybistax*, *Jacaranda*, *Handroanthus*, *Tabebuia* e *Tecoma* utilizando o marcador *psbA-trnH*, com as sequências geradas neste trabalho.