



**Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Ciências Biológicas Bacharelado**



Ana Beatriz de Sousa Freire

DNA Barcode para identificação de espécies arbóreas da família Fabaceae L.

GOIÂNIA

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)s autor(a)(es)(as): Ana Beatriz de Sousa Freire

Título do trabalho: DNA Barcode para identificação de espécies arbóreas da família Fabaceae L.

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Thannya Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 13/12/2024, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Beatriz De Sousa Freire, Discente**, em 14/12/2024, às 09:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5019264** e o código CRC **5CDE2DCC**.

Ana Beatriz de Sousa Freire

**DNA Barcode para a identificação de espécies arbóreas da família Fabaceae
L.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Thannya Nascimento Soares
Coorientadora: Dra. Thainara Policarpo Mendes

GOIÂNIA

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Freire, Ana Beatriz de Sousa
DNA Barcode para identificação de espécies arbóreas da família Fabaceae L. [manuscrito] / Ana Beatriz de Sousa Freire. - 2024.
36 f.

Orientador: Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares; co orientadora Dra. Thainara Policarpo Mendes.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, , Ciências Biológicas, Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas.

1. baru. 2. sucupira-branca. 3. cerejeira. 4. identificação molecular.
5. recursos genéticos. I. Soares, Thannya Nascimento, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos cinco dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “DNA Barcode para identificação de espécies arbóreas da família Fabaceae L.” de autoria de Ana Beatriz de Sousa Freire, do curso de Ciências Biológicas Bacharelado, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Dra. Thannya Nascimento Soares - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito - Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG e Dra. Edivani Villaron Franceschinelli - Instituto de Ciências Biológicas/UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10 (dez), tendo sido o TCC considerado **aprovado**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thannya Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 05/12/2024, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edivani Villaron Franceschinelli, Professora do Magistério Superior**, em 05/12/2024, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito, Usuário Externo**, em 05/12/2024, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5008749** e o código CRC **9D7FB926**.

DEDICATÓRIA

Às mulheres que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho, principalmente as Generosa.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido com o auxílio financeiro do projeto “Rede CoMBaru”, aprovado na CP 02/2023, Proc. nº 202310267001290 (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG), programa Araguaia Vivo, PPBio Araguaia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ecologia, Evolução e Conservação da Biodiversidade (INCT-EECBio) (FAPEG – Processo: 201810267000023, Chamada Nº. 16/2014 e CNPq – Processo: 465610/20145).

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação científica, ao Laboratório de Genética & Biodiversidade (LGBio) e à Universidade Federal de Goiás pela disponibilização de infraestrutura para a realização deste trabalho. Agradeço ainda à equipe de coleta de material botânico, composta por Rafael, Vidal e Victor.

À minha orientadora, Dra. Thannya Nascimento Soares, por direcionar meus passos e confiar na minha capacidade. Sou grata por sua presença em cada etapa deste trabalho e pelo comprometimento com a minha formação acadêmica. Admiro-a pela dedicação como professora e como ser humano. Agradeço à minha coorientadora, Dra. Thainara Policarpo Mendes, por estar sempre disponível, a qualquer hora do dia ou da semana, sempre solícita e disposta. Seu carisma me tranquilizou em momentos difíceis. À Dra. Kássia Miranda, por me ensinar a parte prática de laboratório e me acompanhar durante o início desse processo.

À minha mãe e à minha irmã, pelos esforços, cuidados, carinho e por acreditarem em mim, além dos recursos que me trouxeram até aqui. Pela liberdade de escolher meu caminho, por segurarem minha mão durante o percurso e por aplaudirem cada pequena conquista.

À Isadora Konzen, pelo amor, pelo tempo de qualidade e pela parceria. À Suzani e Cecília por cuidarem de mim neste último ano. E aos meus amigos, por me acompanharem durante a minha graduação, pelos cafés e pelos momentos juntos que foram muito importantes para diminuir o peso dessa jornada.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
6. REFERÊNCIAS	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABGD - Automatic Gap Barcode Discovery;

BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool;

BOLD - Barcode of Life Data System;

CITES - Convention on International Trade in Endangered Species - Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Silvestres Ameaçadas de Extinção;

COI - Gene Citocromo Oxidase I;

ITS - Internal Transcript Spacer - Espaçador Transcrito Interno;

matK - gene Maturase K;

NCBI - National Center for Biotechnology Information;

pb - Pares de Bases;

PCR - Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase;

psbA-trnH - espaçador intergênico não transcrito entre os genes photosystem II protein D1 (psbA) e o gene *trnH*;

rbcL - gene ribulose-1,5-bisfosfato;

TA - Temperatura de anelamento.

RESUMO

A família Fabaceae está entre as Angiospermas mais diversas do mundo, abrangendo plantas de relevância medicinal, alimentícia e madeireira. Um dos desafios para a implementação de ações de fiscalização e conservação é a identificação precisa dos espécimes envolvidos no comércio. A técnica de DNA *barcoding* é promissora para obter resultados rápidos e confiáveis na identificação molecular de espécies. Ela baseia-se em uma região padronizada do DNA em que as divergências genéticas intraespecíficas são menores que as divergências interespecíficas. Neste contexto, foram testadas quatro regiões universais recomendadas para a identificação de plantas (*matK*, *rbcL*, ITS e *psbA-trnH*) em quatro espécies de Fabaceae: *Amburana cearensis* (cerejeira), *Dipteryx alata* (baru), *Pterodon emarginatus* e *Pterodon pubescens* (sucupira-branca). Foram amostrados 39 indivíduos de diferentes populações dessas espécies. Os marcadores foram avaliados quanto à diversidade genética, consultas em bancos de dados (NCBI e BOLD), *Automatic Gap Barcode Discovery* (ABGD) e dendrograma com base no método UPGMA. Dentre as regiões testadas, a *psbA-trnH* apresentou o melhor desempenho na discriminação de espécies congêneres tanto no ABGD quanto no UPGMA e menor identificação de espécies nas plataformas NCBI e BOLD. As regiões *matK* e *rbcL* tiveram melhor desempenho na identificação de espécies no NCBI e BOLD, mas mostraram-se eficazes apenas para a distinção de gêneros, não sendo adequadas para a distinção de espécies congêneres. A região ITS foi descartada das análises de discriminação de espécies devido à falha na amplificação. Portanto, a região *psbA-trnH* é mais adequada para diagnósticos em nível de espécie, enquanto *matK*, *rbcL* e suas combinações funcionam melhor para discriminação em nível de gênero.

Palavras-Chave: baru, sucupira-branca, cerejeira, identificação molecular, recursos genéticos.

ABSTRACT

The Fabaceae family is one of the most diverse Angiosperms in the world, including medicinal, food and timber related plants. One of the challenges to implement supervision and conservation actions is the precise identification of specimens involved in commerce. The DNA barcoding technique is promising to obtain fast and reliable results in molecular identification of species. It is based on a standardized region of DNA in which intraspecific genetic divergences are smaller than interspecific divergences. In this context, four regions universally recommended to plants identification were tested (*matK*, *rbcL*, ITS and *psbA-trnH*) in four Fabaceae species: *Amburana cearensis* (cerejeira), *Dipteryx alata* (baru), *Pterodon emarginatus* and *Pterodon pubescens* (sucupira-branca). 39 individuals from different populations of this species were sampled. The markers were evaluated for genetic diversity, database queries (NCBI and BOLD), Automatic Gap Barcode Discovery (ABGD) and dendrogram based in UPGMA method. Among the regions tested, *psbA-trnH* presented the best performance in congeneric species defining in both ABGD and UPGMA and lower correspondence in NCBI and BOLD queries. The regions *matK* and *rbcL* performed better in NCBI and BOLD queries, however they proved to be only effective for genders distinguishing, not being suitable for congeneric species distinction. The region ITS was discarded as DNA barcode due to amplification failure. Therefore, the *psbA-trnH* is more suitable for diagnosis in species level, while *matK*, *rbcL* and its combinations work better to discrimination in gender level.

Keywords: baru, sucupira-branca, cerejeira, molecular identification, genetic resources.

1. INTRODUÇÃO

O DNA *barcoding* é uma técnica de apoio molecular à taxonomia, proposta por Hebert *et al.* (2003), com a finalidade de identificar espécies utilizando polimorfismos de sequências de DNA. O método baseia-se no uso de uma sequência de DNA padronizada para distinguir indivíduos de diferentes espécies, partindo do princípio de que a variação genética interespecífica é maior que a variação genética intraespecífica (Hebert *et al.*, 2003). Essa abordagem permite discriminar geneticamente espécies em qualquer estágio de desenvolvimento, utilizando uma pequena amostra de DNA de maneira rápida e precisa (Antil *et al.*, 2023; Chase *et al.*, 2005; Hebert *et al.*, 2003). O DNA *barcoding* pode ser aplicado em diferentes áreas, como a identificação de espécies comercializadas ilegalmente para fiscalização (Formentão; Saraiva; Marrero, 2021), a detecção de adulterantes em produtos de plantas medicinais (Tehen *et al.*, 2014), para a estimativa da biodiversidade local com base no DNA extraído de amostras ambientais (Sahu *et al.*, 2023) e a identificação de espécies crípticas, muitas vezes indistinguíveis por métodos morfológicos (Hebert *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2016).

Uma região do gene COI (*Citrocomo Oxidase I*) é bem estabelecida para discriminação de espécies de diferentes táxons animais (Hebert *et al.*, 2003; Posada-López *et al.*, 2023), no entanto, essa mesma região não é utilizada para identificar espécies de plantas devido à alta conservação de sua sequência e à baixa capacidade discriminativa neste grupo (Fazekas *et al.*, 2008; Palmer & Herbon, 1988). Por isso, várias regiões de genomas mitocondriais, plastidiais e nucleares são propostas como candidatas a DNA *barcode* universal de plantas (Cahyaningsih *et al.*, 2022; CBOL Plant Working Group, 2009; Chase *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; CBOL China Plant Working Group, 2011; Jiao *et al.*, 2020; Kress, 2017; Lahaye *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016). Em 2009, o *Plant Working Group* do CBOL (*Consortium Barcode of Life*) recomendou os genes cloroplastidiais *matK* e *rbcL* como os principais *barcodes* para plantas. Posteriormente, em 2011, o *China Plant Working Group* do CBOL incluiu a região intergênica nuclear ITS entre os principais locos de DNA *barcode* de plantas. Já Kress e Erikson (2007) sugeriram o uso da região *psbA-trnH* como um *barcode* adicional. Porém, via de regra são utilizadas diferentes regiões para os diferentes grupos de plantas, além de utilizar mais de uma região para aumentar a precisão da identificação molecular de alguns táxons (CBOL *Plant Working Group*, 2009; Kress & Erikson, 2007; Cahyaningsih *et al.*, 2022).

Fabaceae Lindl. (1836: 148) está entre as famílias mais diversas no Brasil, com 3072 espécies pertencentes a 258 gêneros (Flora do Brasil, 2024). A família incorpora espécies de grande importância econômica tais como a soja e feijão (Carvalho & Gaiad, 2021). Além disso, também

inclui espécies amplamente exploradas como recursos florestais madeireiros e não-madeireiros (e.g. pau-brasil, jatobá, paus-ferro, amburana-de-cheiro, baru, sucupira-branca).

Sucupira-branca se refere a duas espécies irmãs pertencentes à família Fabaceae *Pterodon emarginatus* Vogel (1837: 384) e *Pterodon pubescens* Bentham (1860: 127) popularmente conhecidas pelas suas propriedades medicinais. O óleo extraído de diversas partes dessas plantas é valorizado por suas propriedades biológicas comprovadas, o que sustenta seu uso terapêutico tradicional (Bavaresco *et al.*, 2016; Coelho *et al.*, 2005; Froidi *et al.*, 2023; Kawakami *et al.*, 2021). Além disso, a madeira dessas espécies é considerada de alta qualidade por sua densidade média e resistência à degradação por fungos e insetos, sendo amplamente utilizada para construção civil e naval (Camillo *et al.*, 2016). No Distrito Federal, *P. emarginatus* é protegida e declarada Patrimônio Ecológico pelo Decreto N° 14.738/93, e o corte não autorizado em áreas urbanas é considerado crime ambiental. Estas espécies são nativas, mas não endêmicas do Brasil e ocorrem principalmente nos domínios fitogeográficos da Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado e Pantanal (Carvalho; Cardoso; Lima, 2024a; Carvalho; Cardoso; Lima, 2024b). Enquanto *P. emarginatus* é mais comum nas regiões ao norte, *P. pubescens* predomina nas regiões ao sul do Brasil (Rocha, 2006).

O baru – *Dipteryx alata* Vogel (1837: 383), é também uma espécie de Fabaceae, reconhecida por sua grande relevância para a sociobiodiversidade brasileira. Suas castanhas são ricas em lipídios, proteínas e minerais, o que as torna uma boa fonte nutricional tanto para humanos quanto para animais (Takemoto *et al.*, 2001). Além disso, a espécie é explorada devido à sua madeira densa e resistente ao ataque de fungos e cupins (Sano; Brito; Ribeiro, 2016). Nativa, mas não endêmica do Brasil, esta planta possui ampla distribuição no bioma Cerrado, com melhor adaptação à região Centro-Oeste, conforme observado por Nabout *et al.* (2010). *Dipteryx alata* foi classificada como vulnerável à extinção na Lista Vermelha da International *Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN), em razão do declínio populacional decorrente da fragmentação do seu habitat (IUCN, 2024). Recentemente, em conformidade com a Instrução Normativa nº 1, de 26 de janeiro de 2023, o gênero *Dipteryx* foi incluído no Anexo II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagens (CITES), com as novas regulamentações entrando em vigor a partir de 25 de novembro de 2024.

A cerejeira, também conhecida como umburana-de-cheiro ou cumaru, é uma espécie com o nome científico *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (1940: 30). Ela ocorre em diversos biomas brasileiros, como a Caatinga, o Cerrado, a Mata Atlântica e o Pantanal (Seleme, 2024). Em sua casca, lenho e sementes, são encontradas moléculas aromáticas – as cumarinas – amplamente utilizadas na indústria farmacêutica (Carvalho, 2003; Pessoa & Oliveira, 2018). As folhas, frutos e sementes da espécie são recursos medicinais, empregados no tratamento de vários sintomas e doenças (Almeida *et al.*, 2010). A madeira de *A. cearensis* é altamente resistente ao ataque de

insetos e fungos, o que a torna um material atraente para a fabricação de móveis de luxo e barris de cachaça, especialmente na região nordeste do Brasil (Pareyn *et al.*, 2018). Contudo, a espécie está em perigo de extinção devido à extensão da perda de habitat e ao extrativismo indiscriminado de sua madeira, motivado tanto pela construção de móveis e barris de cachaça quanto pelo seu reconhecido potencial medicinal e farmacológico (Pessoa & Oliveira 2018, IUCN 2024).

A intensificação de atividades como desmatamento, expansão agropecuária e urbanização tem provocado a fragmentação e a perda de habitats, resultando no aumento do risco de extinção dessas espécies (IUCN, 2024). Entretanto, a CITES tem intensificado seus esforços de controle e manejo de diversas espécies florestais. Mas, um dos desafios para sua implementação é a identificação precisa dos espécimes envolvidos no comércio e rastreamento de produtos derivados (Jiao *et al.*, 2020). Nesse contexto, o DNA *barcoding* é uma ferramenta valiosa para a identificação rápida e precisa de espécies arbóreas, especialmente aquelas ameaçadas de extinção ou exploradas economicamente. A aplicação dessa técnica permite o monitoramento efetivo de espécies protegidas, o combate ao comércio ilegal de produtos florestais e o apoio às políticas de conservação. Portanto, é crucial o desenvolvimento de estudos que explorem e validem regiões de DNA *barcode* adequadas para a identificação molecular dessas espécies, especialmente em face das crescentes pressões ambientais e econômicas que ameaçam sua sobrevivência.

Neste estudo, testamos quatro regiões, sendo três regiões do DNA cloroplastidial *rbcL*, *matK* e *psbA-trnH* e as regiões ITS do DNA nuclear (Jiao *et al.*, 2020), para serem utilizadas como DNA *Barcode* em quatro espécies arbóreas da família Fabaceae.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

As coletas botânicas foram realizadas anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética & Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal de Goiás (UFG), no qual foram criados bancos de tecido foliar e de DNA. Assim, as amostras utilizadas no presente estudo são provenientes dos bancos do LGBio. Para as espécies que dispunham apenas de tecido foliar, o DNA foi extraído utilizando o protocolo de extração CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1987). No total foram amostrados 39 indivíduos de diferentes populações: quatro de *A. cearensis*, doze de *D. alata*, onze de *P. emarginatus* e doze de *P. pubescens* (Tabela 1).

Tabela 1. Códigos e os locais de coleta dos 39 indivíduos das espécies *Amburana cearensis*, *Dipteryx alata*, *Pterodon emarginatus* e *P. pubescens* (Fabaceae).

Espécie	Código	População
<i>Amburana cearensis</i>	ACERJ_07	Rio de Janeiro - RJ
	ACEUFGGO_03	Universidade Federal de Goiás - GO
	ACESMPQGO	São Miguel do Passa Quatro - GO
	ACEALPGO	Alto Paraíso - GO
<i>Dipteryx alata</i>	DALPINMG_06	Pintópolis - MG
	DALARIMG_04	Arinos - MG
	DALJANGO_05	Jandaia - GO
	DALLZNGO_04	Luziânia - GO
	DALSONMS_08	Sonora - MS
	DALICESP_01	Icem - SP
	DALMAMMG_01	Monte Alegre de Minas - MG
	DALSAMGO_02	São Miguel do Araguaia - GO
	DALCAMMS_05	Camapuã - MS
	DALCOCMT_20	Cocalinho - MT
	DALNATTO_06	Natividade - TO
DALAQAMS_03	Aquidauana - MS	
<i>Pterodon pubescens</i>	PPUARUGO_27	Aruanã - GO
	PPUPERMG_16	Perdizes - MG
	PPUSCALGO_29	Serra de Caldas - GO
	PPUTUPMG_02	Tupaciguara - MG
	PPUSFRGO_32	São Francisco de Goiás - GO
	PPUCALGO_13	Caldas Novas - Goiás
	PPUPONGO_06	Pontalina - Goiás
	PPUPOTGO_29	Portelândia - Goiás
	PPUBAGMT_18	Barra do Garças - MT
	PPUNOXMT_19	Nova Xavantina - MT
PPUHIDGO_22	Hidrolândia - GO	
PPUARGMT_27	Araguaiana - MT	
<i>Pterodon emarginatus</i>	PEMCARTO_07	Cariri - TO
	PEMNCRGO_07	Nova Crixás - GO
	PEMSRNGO_06	Santa Rita do Novo Destino - GO
	PEMPORGO_13	Porangatu - GO
	PEMLEMBA_10	Luiz Eduardo Magalhães - BA
	PEMAPAGO_23	Alto Paraíso - GO
	PEMANOGO_03	Alvorada do Norte - GO
	PEMCBEGO_24	Campos Belos de Goiás - GO
	PEMCARMA_19	Carolina - MA
	PEMARÇUTO_21	Araguaçu - TO
PEMFATTO_11	Fátima - TO	

O DNA extraído foi quantificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). As bandas de DNA obtidas no gel foram comparadas com marcadores de massa molecular. Em seguida, o DNA foi diluído para uma concentração final de 2,5 ng/ μ L.

Amplificação e sequenciamento

As regiões testadas neste trabalho foram as mais utilizadas para espécies madeireiras, de acordo com Jiao *et al.* (2020). Os *primers* bem como suas sequências estão listados na Tabela 2. As reações de PCR foram realizadas com volume final de 15 μ L, com 5,3 μ L de água milli-Q®; 2,5 μ L de DNA (2,5 ng/ μ L); 1,2 μ L de cada primer (1 μ M); 1,5 μ L de Tp (10X) com MgCl₂ (10 mM); 1,5 μ L de BSA (25 mg/mL); 1,5 μ L de dNTP's (2,5 μ M) e 0,3 μ L de Taq DNA polimerase (5 U). O programa de amplificação foi realizado no termociclador Veriti™ *Thermal Cycler* nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* por 1 min (temperatura de anelamento na Tabela 2), extensão a 72°C por 1 min e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

Tabela 2. Regiões do DNA, nomes, sequências e as referências dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento, além das temperaturas de anelamento (TA) aplicadas na amplificação por PCR.

Região	Primer	Sequência 5'-3'	Referência	TA (°C)
<i>matK</i>	3F_KIM f 1R_KIM r	F - CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG R - ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTCC	K. J. Kim (não publicado)	50 - 54
<i>rbcL</i>	rbcLa_f rbcLa_r	F - ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC R - GTAAATCAAGTCCACCRCG	Kress & Erickson (2007)	50
<i>psbA - trnH</i>	psbA3 f trnHf_05	F - GTTATGCATGAACGTAATGCTC R - CGCGCATGGTGGATTCAATCC	Sang <i>et al.</i> (1997); Tate & Simpson (2003)	55
ITS	AB(101) AB(102)	F- ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTC R - TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	Sun <i>et al.</i> (1994)	58

Para verificar o padrão de amplificação foi realizada a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de PCR foram comparados com o marcador 1 kb plus (Invitrogen®). A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando as enzimas Exo-SAP (*Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase*) numa proporção de 1:9 (Exo:SAP). A reação de sequenciamento foi preparada utilizando o kit *BigDye Terminator*. Em seguida, o produto da reação foi precipitado e diluído em 10 μ L de formamida Hi-Di e, posteriormente, desnaturada a 95°C. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese

capilar no analisador genético ABI 3500 (*Applied Biosystems*®). Para cada fragmento amplificado, foram realizadas duas reações de sequenciamento, nas direções *forward* e *reverse* da fita de DNA.

As sequências obtidas foram editadas no programa SeqScape v.3.0 (*Applied Biosystems*®) para obtenção das fitas consensos. Os alinhamentos das sequências foram realizados no *ClustalW* (*multiple sequence alignment*) acessado pelo programa BioEdit 7.7, onde foram executadas correções manuais quando necessário.

Pesquisa de similaridade

As sequências finais foram comparadas com outras sequências das mesmas regiões disponíveis nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com uso da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) e priorizando o *E-valor*. As sequências também foram comparadas na ferramenta de busca *Identification System* (IDS) do *Barcode Of Life Database* (BOLD) para determinar a melhor correspondência de espécies. No BOLD, não há suporte para a comparação de sequências da região *psbA-trnH*, e, por esse motivo, as sequências dessa região não foram incluídas nas análises comparativas nessa plataforma.

Diversidade genética

Realizamos análises de diversidade nucleotídica, diversidade haplotípica, número de haplótipos e sítios polimórficos dentro e entre as espécies com auxílio do programa DnaSP v6 (Rozas *et al.*, 2017).

Automatic Barcode Gap Discovery

As sequências também foram avaliadas no *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD), um *software* utilizado para buscar a lacuna entre a distância genética intraespecífica máxima e a distância genética interespecífica mínima, a diferença é o chamado *barcode gap*. Inicialmente o ABGD calcula uma matriz de distâncias entre as sequências fornecidas e usa essa informação para encontrar a primeira lacuna entre as distâncias intraespecífica e interespecífica. Em seguida, ele gera uma lista de grupos que são interpretados como espécies de acordo com a matriz de distância calculada. O método é aplicado recursivamente para refinar ainda mais as partições até que não haja mais divisões possíveis, ficando ao pesquisador a responsabilidade de escolher qual partição escolher no contexto biológico e taxonômico dos organismos estudados (Puillandre *et al.*, 2012). O modelo evolutivo selecionado foi Kimura 2-Parâmetros (K2P) e $P_{\min}=0.001$, $P_{\max}=0.1$, e $X=1.5$.

Dendrograma

As matrizes de distâncias genéticas geradas pelo programa ABGD foram utilizadas para a construção dos dendrogramas aplicando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando o software R (versão 4.4.2). O pacote utilizado para essas análises foi o ggplot2.

3. RESULTADOS

Amplificação e sequenciamento

A amplificação ocorreu com sucesso para as regiões do DNA cloroplastial: *matK*, *rbcL* e *psbA-trnH* (Figura 1 e 2), em todas as espécies. No entanto, enfrentamos problemas com a amplificação para a região de DNA nuclear (ITS), o que resultou na formação de múltiplas bandas como indica a Figura 3. Em razão disso, a região ITS foi excluída das análises subsequentes.

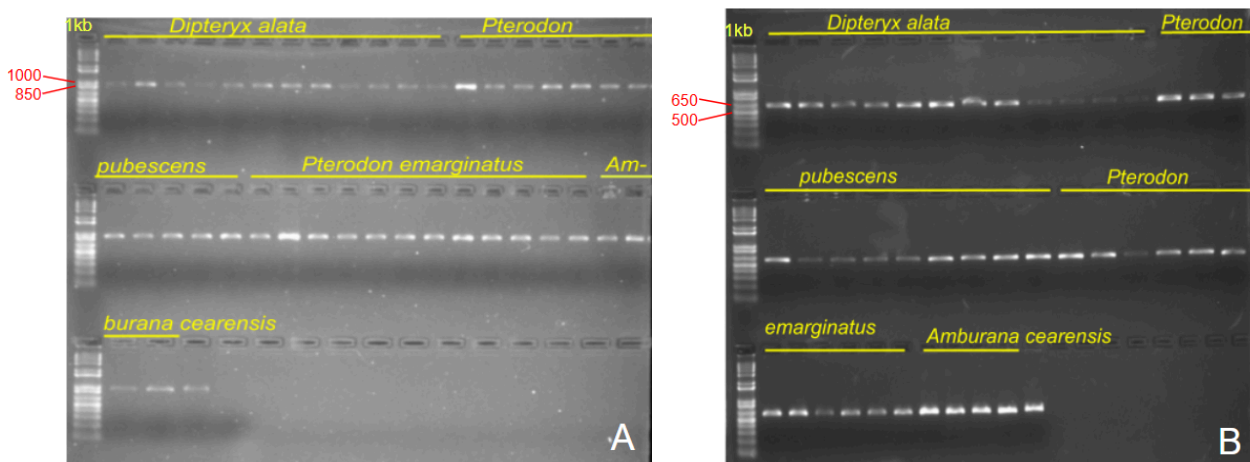


Figura 1. Eletroforese horizontal do produto de amplificação. Em (A) *matK*, (B) *rbcL*.

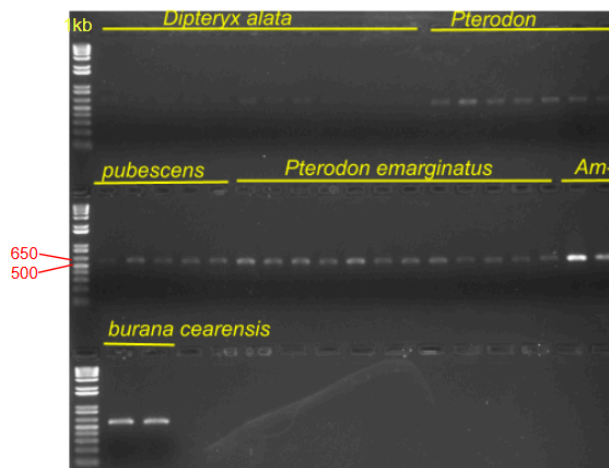


Figura 2. Eletroforese horizontal do produto de amplificação da região *psbA-trnH*.

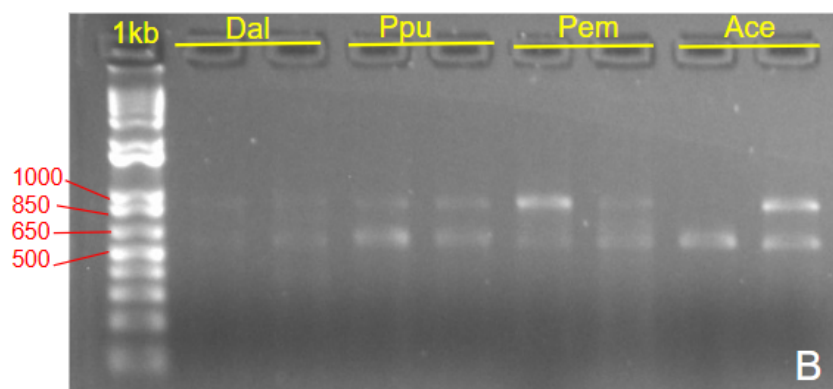


Figura 3. Eletroforese horizontal do produto de amplificação inespecífica da região ITS. Dal: *D. alata*, Ppu: *P. pubescens*, Pem: *P. emarginatus* e Ace: *A. cearensis*.

O tamanho dos produtos amplificados de acordo com os géis de eletroforese foi de aproximadamente 900 pb para *matK* e 550 pb para *rbcL* e *psbA-trnH*. O tamanho esperado para estas regiões é aproximadamente 850 pb (*matK*), 550 pb (*rbcL*) e 475-545 bp (*psbA-trnH*) (Kress & Erickson 2007; Tate & Simpson, 2003).

O sucesso de sequenciamento foi de 100% para *matK* e *rbcL*. Entretanto, o *psbA-trnH* apresentou problemas no sequenciamento dos indivíduos de *D. alata*, de modo que esta região não pode ser avaliada para esta espécie, mesmo com alteração no protocolo de PCR. O comprimento das sequências geradas foi de 904 para *matK*, 574 pb para *rbcL* e 718 pb para *psbA-trnH*. Após o alinhamento e corte das extremidades, todas as sequências ficaram com 556 pb, 540 pb e 454 pb para *matK*, *rbcL* e *psbA-trnH*, respectivamente.

Diversidade genética

Os valores de diversidade haplotípica (H) e nucleotídica (π) foram maiores na região intergênica (*psbA-trnH*) em comparação às regiões gênicas (*matK* e *rbcL*) (Tabela 3). No total, foram identificados cinco haplótipos (h) em *psbA-trnH*, quatro em *matK* e três em *rbcL* (os haplótipos estão descritos nas Tabelas 4-6). Além disso, o número de sítios polimórficos (S) no espaçador intergênico é de 3 a 5.5 vezes maior que nas regiões *matK* e *rbcL*, respectivamente.

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética intraespecífica e interespecífica referente às regiões *matK*, *rbcL* e *psbA-trnH* nas espécies *Amburana cearensis*, *Dipteryx alata*, *Pterodon emarginatus* e *P. pubescens*, em que N: número de sequências, h: número de haplótipos, H: diversidade haplotípica, S: número de sítios polimórficos e π : diversidade nucleotídica.

Espécie	<i>matK</i>					<i>rbcL</i>					<i>psbA-trnH</i>				
	N	h	H	S	π	N	h	H	S	π	N	h	H	S	π
<i>A. cearensis</i>	4	1	0.000	0	0.00000	4	1	0.000	0	0.00000	4	2	0.500	1	0.00133
<i>D. alata</i>	12	1	0.000	0	0.00000	12	1	0.000	0	0.00000	-	-	-	-	-
<i>P. emarginatus</i>	11	2	0.182	1	0.00033	11	1	0.000	0	0.00000	11	1	0.000	0	0.00000

<i>P. pubescens</i>	12	1	0.000	0	0.00000	12	1	0.000	0	0.00000	12	2	0.409	1	0.01776
Entre <i>Pterodon</i>	23	2	0,087	1	0,00016	23	1	0,000	0	0,00000	23	3	0,628	5	0,00649
Entre espécies	39	4	0.591	31	0.01269	39	3	0.561	17	0.00984	27	5	0.724	93	0.07694

Tabela 4. Sequência de polimorfismos entre os quatro haplótipos da região *matK*, o número em cada coluna deve ser lido na vertical e indica a posição do nucleotídeo.

Haplótipo	Sítios polimórficos															Indivíduo																
	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5									
	2	4	5	5	6	8	9	7	8	1	2	4	5	6	8	3	3	4	7	7	9	9	0	1	5	5	7	7	0	3		
	5	5	1	8	9	9	1	6	5	1	3	9	9	5	0	2	0	5	3	4	7	4	5	2	6	3	8	5	7	6	0	
H1	C	A	T	A	T	C	C	C	C	T	C	C	G	T	G	T	G	T	C	G	C	G	A	G	G	C	G	T	G	G	A	1-4
H2	T	G	C	.	A	C	T	A	T	T	C	A	C	A	C	A	C	A	A	C	A	G	C	A	G	A	G	A	A	T	5-16	
H3	T	G	C	G	C	T	A	T	T	C	A	A	A	C	A	C	A	C	A	A	T	A	G	C	A	G	A	G	A	A	C	17
H4	T	G	C	A	C	T	A	T	T	C	A	A	A	C	A	C	A	C	A	A	T	A	G	C	A	G	A	G	A	A	C	18-39

1 - ACERJ_07, 2 - ACEUFGGO_03, 3 - ACESMPQGO, 4 - ACEALPGO, 5 - DALPINMG_06, 6 - DALARIMG_04, 7 - DALJANGO_05, 8 - DALLZNGO_04, 9 - DALSONMS_08, 10 - DALICESP_01, 11 - DALMAMMG_01, 12 - DALSAMGO_02, 13 - DALCAMMS_05, 14 - DALCOCMT_20, 15 - DALNATTO_06, 16 - DALAQAMS_03, 17 - PEMCARTO_07, 18 - PEMNCRGO_07, 19 - PEMS RNGO_06, 20 - PEMPORGO_13, 21 - PEMLEMB A_10, 22 - PEMAPAGO_23, 23 - PEMANOGO_03, 24 - PEMCBEGO_24, 25 - PEMCARMA_19, 26 - PEMARÇUTO_21, 27 - PEMFATTO_11, 28 - PPUARUGO_27, 29 - PPUPERMG_16, 30 - PPUSCALGO_29, 31 - PPUTUPMG_02, 32 - PPUSFRGO_32, 33 - PPUCALGO_13, 34 - PPUPONGO_06, 35 - PPUPOTGO_29, 36 - PPUBAGMT_18, 37 - PPUNOXMT_19, 38 - PPUHIDGO_22, 39 - PPUARGMT_27.

Tabela 5. Sequência de polimorfismos entre os quatro haplótipos da região *rbcL*, o número em cada coluna deve ser lido na vertical e indica a posição do nucleotídeo.

Haplótipo	Sítios polimórficos															Indivíduo				
											1	1	2	2	2	2	2	2	3	
			2	4	5	5	6	8	9	7	8	1	2	4	5	6	8	3		
		5	5	1	8	9	9	1	6	5	1	3	9	9	5	0	2	0		
H1	C	G	C	G	A	G	C	G	T	C	T	G	C	C	C	G	T	1-4		
H2	T	C	G	C	G	A	T	A	C	C	T	T	C	C	T	A	C	5-16		
H3	T	G	G	G	G	A	T	A	C	A	G	T	G	T	T	T	C	17-39		

1 - ACERJ_07, 2 - ACEUFGGO_03, 3 - ACESMPQGO, 4 - ACEALPGO, 5 - DALPINMG_06, 6 - DALARIMG_04, 7 - DALJANGO_05, 8 - DALLZNGO_04, 9 - DALSONMS_08, 10 - DALICESP_01, 11 - DALMAMMG_01, 12 - DALSAMGO_02, 13 - DALCAMMS_05, 14 - DALCOCMT_20, 15 - DALNATTO_06, 16 - DALAQAMS_03, 17 - PEMCARTO_07, 18 - PEMNCRGO_07, 19 - PEMS RNGO_06, 20 - PEMPORGO_13, 21 - PEMLEMB A_10, 22 - PEMAPAGO_23, 23 - PEMANOGO_03, 24 - PEMCBEGO_24, 25 - PEMCARMA_19, 26 - PEMARÇUTO_21, 27 - PEMFATTO_11, 28 - PPUARUGO_27, 29 - PPUPERMG_16, 30 - PPUSCALGO_29, 31 - PPUTUPMG_02, 32 - PPUSFRGO_32, 33 - PPUCALGO_13, 34 - PPUPONGO_06, 35 - PPUPOTGO_29, 36 - PPUBAGMT_18, 37 - PPUNOXMT_19, 38 - PPUHIDGO_22, 39 - PPUARGMT_27.

Pesquisa de similaridade

Utilizamos as sequências obtidas para avaliar a precisão na identificação das espécies por meio do BLASTn. Para *matK* e *rbcL*, as consultas de *A. cearensis* e *D. alata* retornaram a identificação correta com identidade máxima. Já as identificações de *Pterodon* foram ambíguas, pois o banco de dados retornou ambas as espécies (*P. emarginatus* e *P. pubescens*) com a mesma taxa de similaridade (100%). Esse resultado era esperado, considerando que as duas espécies apresentam sequências idênticas nas regiões analisadas. Para *psbA-trnH*, as consultas de *A. cearensis* retornaram a espécie correta com média de percentual de identidade de 99,48%. Já as identificações de *Pterodon* chegaram a nível de gênero, uma vez que as sequências de *P. emarginatus* e *P. pubescens* apresentaram maior correspondência com *P. abruptus* com percentual de similaridade médio de 92,08% e 91,41%, respectivamente.

No sistema de identificação do BOLD, para a região *matK* as identificações para sequências de *A. cearensis* foram corretas com similaridade máxima. Para *Dipteryx alata*, as identificações foram ambíguas, pois o banco de dados retornou as espécies *D. odorata*, *D. punctata*, *D. rosea* e *D. alata*, todas com 100% de similaridade. As identificações para *Pterodon* também foram ambíguas, pois as duas espécies apresentam sequências idênticas na região analisada e portanto tiveram a mesma porcentagem de similaridade (100%). Para *rbcL*, as consultas de *D. alata* tiveram identificações ambíguas – a mesma similaridade (98,81%) com *D. alata* e *D. oleifera*. As espécies *P. emarginatus* e *P. pubescens* não possuem *barcodes* registrados para a região *rbcL* no BOLD e *A. cearensis* foi identificada incorretamente, mesmo havendo registros de barcode da espécie para a região. A região *psbA-trnH* não foi consultada nesta plataforma uma vez que não há registro para a região.

Automatic Barcode Gap Discovery

Os resultados da análise da região *matK* com o ABGD revelaram a formação de três grupos de espécies baseados na distância genética, Grupo 1: *D. alata*, Grupo 2: *P. emarginatus* e *P. pubescens* e Grupo 3: *A. cearensis*. A distância máxima entre indivíduos da mesma espécie e entre as espécies congêneres foi de 0,0018 e a distância mínima entre indivíduos de gêneros diferentes foi acima de 0,0073 (Figura 6). Sendo que, a primeira barra corresponde às distâncias intraespecífica e entre espécies congêneres, a segunda e a terceira barra às distâncias entre os gêneros *Dipteryx* e *Pterodon*, a quarta barra às distâncias entre os gêneros *Dipteryx* e *Amburana* e a quinta barra às distâncias entre os gêneros *Pterodon* e *Amburana*.

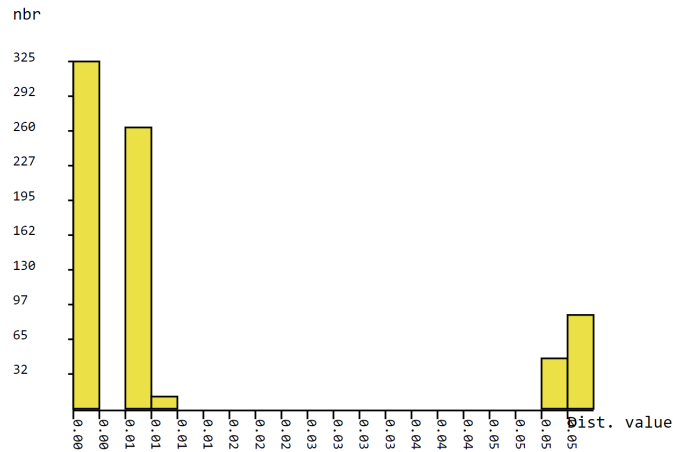


Figura 6. Histograma de distância genética gerado no ABGD para a região *matK* com as espécies *Amburana cearensis*, *Dipteryx alata*, *Pterodon emarginatus* e *Pterodon pubescens*.

O mesmo padrão foi observado para a região *rbcL*, na qual também houve a formação dos mesmos três grupos, Grupo 1: *D. alata*, Grupo 2: *P. emarginatus* e *P. pubescens* e Grupo 3: *A. cearensis*. A distância entre indivíduos da mesma espécie e entre as espécies congêneres foi de 0,0000 e a distância entre indivíduos de gêneros diferentes foi acima de 0,0131 (Figura 7). Sendo que, a primeira barra corresponde às distâncias intraespecífica e entre espécies congêneres, a segunda barra às distância entre os gêneros *Dipteryx* e *Pterodon*, a terceira barra às distâncias entre os gêneros *Dipteryx* e *Amburana* e quarta barra às distâncias entre os gêneros *Pterodon* e *Amburana*.

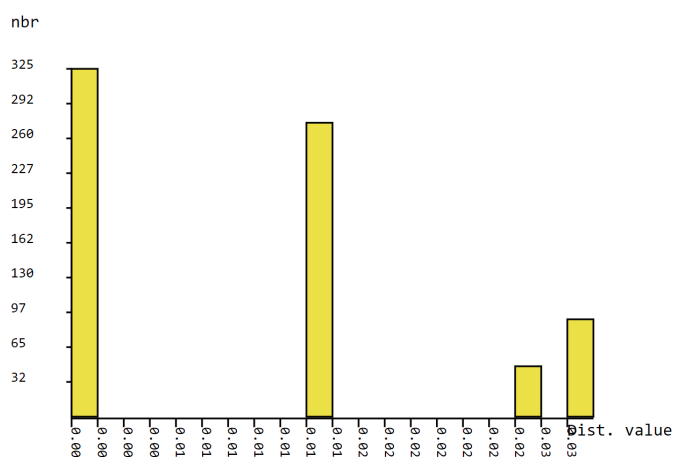


Figura 7. Histograma de distância genética gerado no ABGD para a região *rbcL* com as espécies *Amburana cearensis*, *Dipteryx alata*, *Pterodon emarginatus* e *Pterodon pubescens*.

Os resultados obtidos da análise da região *psbA-trnH* são mais complexos. Embora as partições em geral tenham separado os três grupos de espécies baseadas na distância genética (Grupo 1: *P. emarginatus*, Grupo 2: *P. pubescens* e Grupo 3: *A. cearensis*) o gráfico de distâncias não revelou uma lacuna verdadeira, mesmo não havendo sobreposição de distâncias intra e interespecífica. A distância intraespecífica máxima foi 0,0027 e a distância interespecífica mínima foi 0,0107 (Figura 8). A primeira barra corresponde às distâncias entre *P. emarginatus* e *P. pubescens*, a segunda e terceira barra correspondem às distâncias entre os gêneros *Amburana* e *Pterodon*.

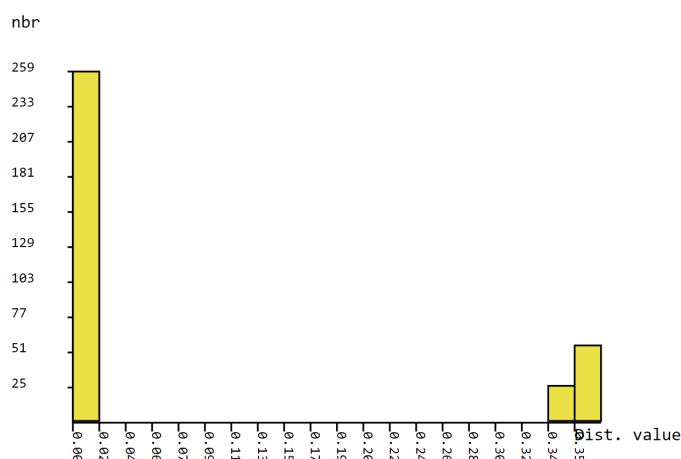


Figura 8. Histograma de distância genética gerado no ABGD para a região *psbA-trnH* com as espécies *Amburana cearensis*, *Pterodon emarginatus* e *Pterodon pubescens*.

Para confirmar se havia sobreposição das distâncias genéticas intraespecífica e interespecífica para *psbA-trnH* excluimos as sequências da espécie *A. cearensis* da análise do ABGD. O resultado revelou uma lacuna clara entre as distâncias genéticas das duas espécies congêneras (*P. emarginatus* e *P. pubescens*) (Figura 9). Portanto, inferimos que a ausência da lacuna no histograma do *psbA-trnH* (Figura 8) deve-se à grande distância genética entre os gêneros *Pterodon* e *Amburana* (0,32) (Figura 8) e não à sobreposição das distâncias intraespecíficas e interespecíficas. A primeira, segunda e terceira barra correspondem às distâncias intra específicas, a quarta, quinta e sexta barra correspondem às distâncias interespecíficas.

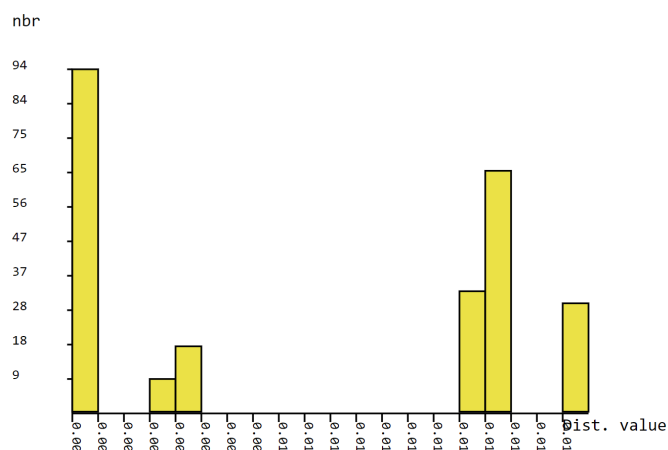
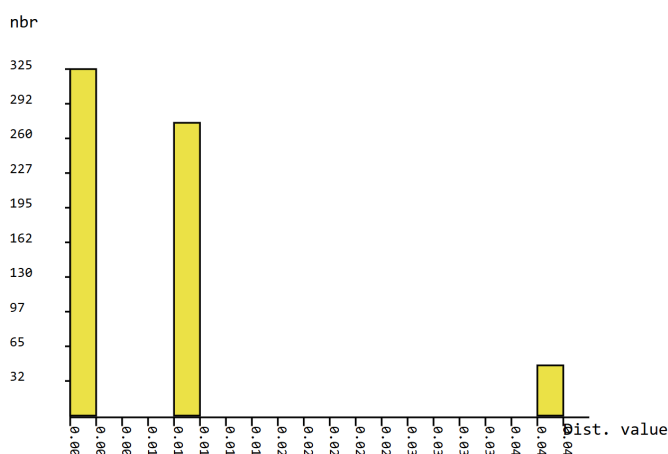


Figura 9. Histograma de distância genética gerado no ABGD com as seqüências de *P. emarginatus* e *P. pubescens* da região *psbA-trnH*. A distância máxima intraespecífica foi 0,0027 e a distância interespecífica mínima foi 0,0107.

Utilizamos também as regiões *matK* e *rbcL* combinadas a fim de avaliar o poder discriminativo quando utilizadas em conjunto. O resultado mostra o mesmo padrão das regiões únicas, na qual houve a formação dos mesmos três grupos, Grupo 1: *D. alata*, Grupo 2: *P. emarginatus* e *P. pubescens* e Grupo 3: *A. cearensis*. A distância entre indivíduos da mesma espécie e entre as espécies congêneres foi de 0,0000 e a distância entre indivíduos de gêneros diferentes foi acima de 0,0102 (Figura 10). A primeira barra é correspondente às distâncias intraespecífica e entre espécies congêneres, a segunda barra às distâncias entre os gêneros *Dipteryx* e *Pterodon* e a terceira barra às distâncias entre os gêneros *Dipteryx*, *Amburana* e *Pterodon*.



Dendrograma

No dendrograma de *matK* houve a formação de três grupos (*cluster*) distintos bem delimitados, o grupo composto por indivíduos de *A. cearensis*, o grupo composto pelos indivíduos de *D. alata* e o grupo composto pelos indivíduos de *P. pubescens* e *P. emarginatus* (Figura 11). *D. alata* surgiu como grupo irmão de *Pterodon* e ambos formaram grupo irmão com *A. cearensis*.

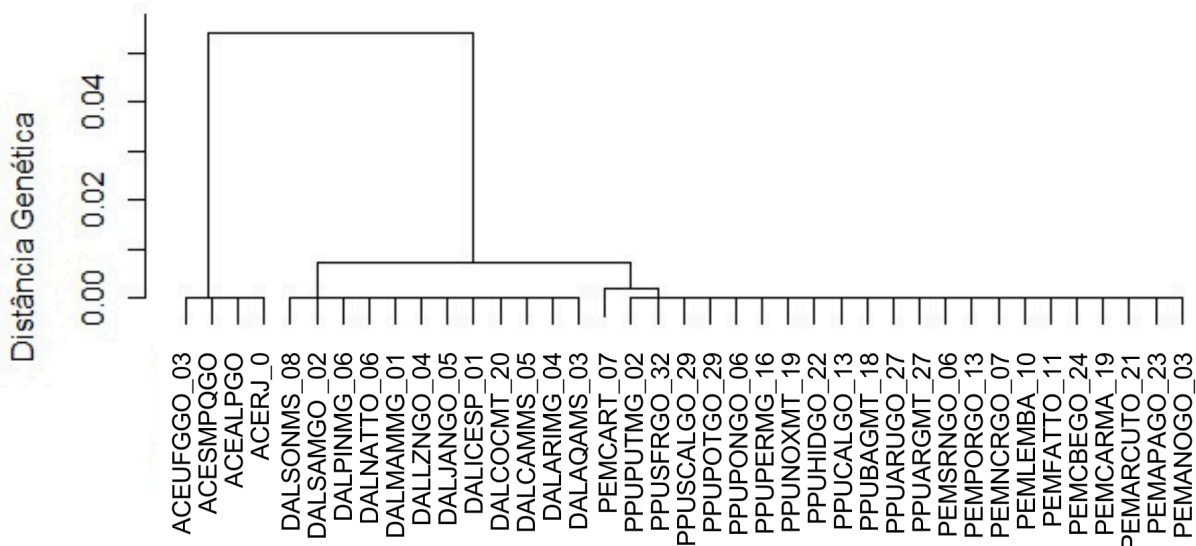


Figura 11. Dendrograma construído com base no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando os dados moleculares da região *matK*.

A análise para o *rbcL* foi consensual com o *matK* em mostrar um grupo com todos os indivíduos das duas espécies do gênero *Pterodon*, um grupo composto por indivíduos de *D. alata* e grupo com todos os indivíduos de *A. cearensis*. *Pterodon* emergiu como uma linhagem irmã de *D. alata* e ambos formaram grupo irmão de *A. cearensis* (Figura 12).

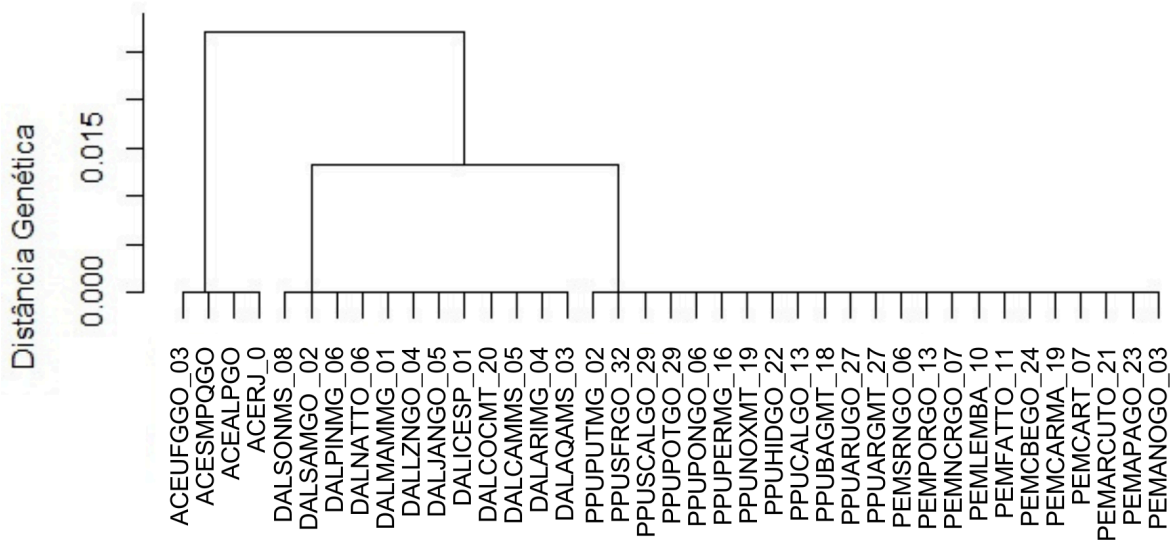


Figura 12. Dendrograma construído com base no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando os dados moleculares da região *rbcL*.

Assim como na análise de ABGD, o dendrograma construído com com a região intergênica *psbA-trnH* foi mais complexo que os demais. Nesta análise não foram amostrados indivíduos de *D. alata*. Houve a formação de três grupos principais: o grupo de *A. cearensis*; o grupo com todos os indivíduos de *P. emarginatus*; e o grupo de *P. pubescens*, sendo que este último formou duas linhagens, sendo uma delas composta por três populações (Nova Xavantina-MT, Pontalina-GO e Araguaiana-MT). *P. emarginatus* emergiu como grupo irmão de *P. pubescens* e ambos formaram grupo irmão de *A. cearensis* (Figura 13).

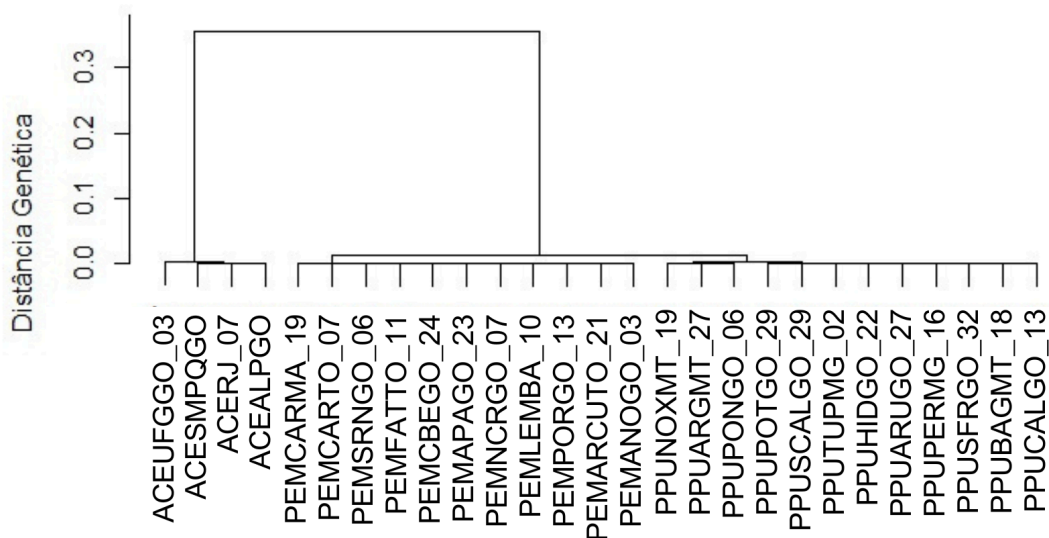


Figura 13. Dendrograma construído com base no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando os dados moleculares da região *psbA-trnH*.

Assim como observado no dendrograma das regiões *matK* e *rbcL*, o dendrograma das regiões concatenadas também revelou a formação de três grupos distintos: um grupo formado pelos indivíduos de *A. cearensis*, outro composto pelos indivíduos de *D. alata*, e o terceiro por indivíduos de *P. pubescens* e *P. emarginatus*. *D. alata* emergiu como grupo irmão de *Pterodon*, e ambos, por sua vez, formaram um grupo irmão com *A. cearensis* (Figura 14).

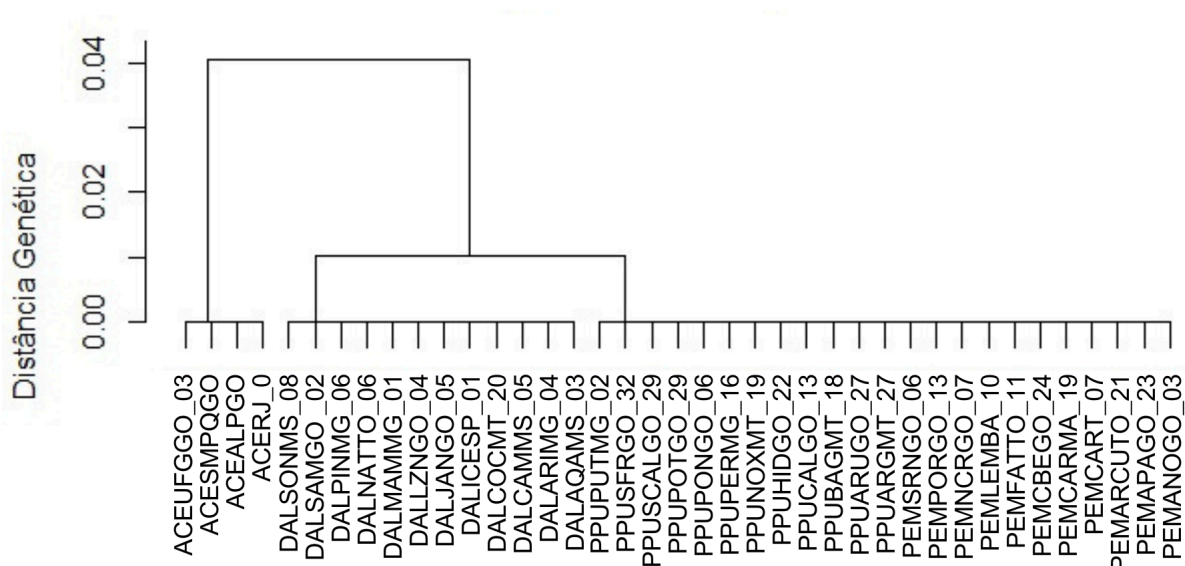


Figura 14. Dendrograma construído com base no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando os dados concatenados das regiões *matK* e *rbcL*.

4. DISCUSSÃO

A universalidade e o poder discriminativo são características essenciais para um DNA *barcode* eficiente (Kress & Erickson, 2007). A universalidade consiste na fácil amplificação e sequenciamento da região. No que diz respeito à universalidade, os marcadores *matK* e *rbcL* apresentaram os melhores desempenhos, embora não tenham demonstrado poder discriminativo suficiente para distinguir espécies dentro do mesmo gênero. A região *psbA-trnH* destacou-se com o maior poder discriminativo entre espécies, mas apresentou menor universalidade em comparação com as regiões gênicas. Por outro lado, a região nuclear ITS não pode ser avaliada quanto ao poder discriminativo.

O *matK* foi o marcador com melhor desempenho na identificação de espécies quando consultado nas bases de dados (NCBI e BOLD) em comparação com as regiões *rbcL* e *psbA-trnH*.

O *rbcL* teve a mesma resolução de espécie que o *matK* no NCBI, embora seu desempenho tenha sido inferior nas buscas do BOLD inclusive pela falta de *barcode* para *P. emarginatus* e *P. pubescens* nesta região. O *psbA-trnH*, apresentou desempenho inferior no NCBI (14,8% identificações de espécies e 85,2% identificações de gênero), sendo que as identificações a nível de gênero resultaram da alta similaridade entre as duas espécies de *Pterodon* analisadas, especialmente com *P. abruptus*. Estudos filogenéticos recentes indicam que *P. emarginatus* é mais proximamente relacionado a *P. abruptus* do que a *P. pubescens*, devido a eventos de vicariância que ocorreram há cerca de 4,7 milhões de anos e resultaram na separação dessas espécies. Esses eventos levaram à especiação de *P. abruptus*, atualmente endêmico da Caatinga, e de *P. emarginatus*, que ocorre no Cerrado e na Caatinga. (Carvalho *et al.*, 2024). Isso indica que as relações entre espécies do gênero *Pterodon* ainda são confusas e precisam de mais investigações. Além disso, o *psbA-trnH* foi o único marcador que não teve registros correspondentes no sistema de identificação do BOLD. Esses resultados contrastam com os achados de Meiklejohn *et al.* (2019), que observaram que ambas as plataformas não apresentaram diferenças significativas na identificação de plantas.

Ademais, estima-se que existam aproximadamente 500 mil espécies de plantas terrestres no mundo (Corletti, 2016). Dentre essas, apenas 0,26–0,29% espécies possuem o genoma sequenciado (Bernal-Gallardo & de Folter, 2024). Enquanto na plataforma do BOLD, dos 19.303 milhões registros de *barcodes*, apenas 72 mil correspondem a espécies vegetais. Esses dados refletem a falta de correspondência das sequências quando consultadas no BOLD, destacando a necessidade de ampliar a contribuição de informações de plantas, pois a capacidade dos DNA *barcodes* de atribuir espécies à uma sequência depende das bibliotecas de comparação como NCBI e BOLD.

No que diz respeito à capacidade discriminativa, as análises de diversidade genética, os grupos gerados pelo ABGD e UPGMA estão em concordância. Os marcadores *matK* e *rbcL* se mostraram eficientes na distinção de gêneros no ABGD, já que as distâncias entre os gêneros foram maiores do que as distâncias dentro dos gêneros e na análise UPGMA os gêneros formaram *clusters* bem definidos. Entretanto, esses dois marcadores se mostraram incapazes de discriminar espécies do mesmo gênero nestas duas análises. Resultados de filogenia sugerem que as duas espécies de *Pterodon* compartilham uma relação evolutiva recente, com divergência temporal de aproximadamente 10 mil anos (Lima, 2019), o que pode explicar a dificuldade da discriminação dessas espécies observada com os marcadores *matK* e *rbcL*. Além disso, estudos elaborados por Rocha (2006) e Lima *et al.* (2023) suportam a ocorrência de híbridos naturais, especialmente em locais com sobreposição geográfica, devido ao isolamento reprodutivo incompleto. Fatores de hibridização e introgressão como observados entre as espécies de *Pterodon* dificultam o estabelecimento de um DNA *barcode* (Hebert *et al.*, 2003). Lima (2019) propõe que a divergência entre as espécies de *Pterodon* e *Dipteryx* ocorreu há aproximadamente 4 milhões de anos, o que,

devido à considerável distância evolutiva entre esses gêneros, pode ter favorecido sua discriminação nos estudos de DNA *barcoding* e UPGMA. embora filogenias recentes tenham verificada que *Pterodon emarginatus* é mais próxima de *P. abruptus* do que *P. pubescens* devido a eventos de vicariância ocorrido durante o Plioceno Inferior (~ 4,7 milhões de anos) em *Pterodon* deu origem às duas espécies – *P. abruptus*, endêmico da Caatinga, e a *P. emarginatus*, distribuído no Cerrado e Caatinga

Apesar de observarmos a eficiência dos marcadores de forma isolada, um estudo realizado por Rajaram *et al.* (2019) sugere que a combinação de dois, três ou quatro marcadores elevam a resolução da espécie devido às variações adicionadas. Entretanto, no presente estudo a combinação dos dois marcadores de genes cloroplastidiais *matK* e *rbcL* não aumentou consideravelmente o poder discriminativo em relação a região *rbcL* utilizada sozinha.

Por outro lado, o *psbA-trnH* apresentou o maior número de sítios variáveis dentre as regiões testadas, o que reflete seu maior poder discriminativo no ABGD e no UPGMA, sendo o único marcador capaz de separar as espécies do mesmo gênero. Na análise UPGMA, observamos que as populações de *Pterodon* formaram duas linhagens distintas, e não uma linhagem única como demonstraram o *matK* e *rbcL*. Essa diferença pode ser explicada pela maior sensibilidade da região intergênica *psbA-trnH* às variações genéticas e eventos de divergência evolutiva. Por outro lado, as regiões gênicas geralmente apresentam uma taxa de evolução mais lenta, pois estão sob maior pressão seletiva (Palmer & Herbon, 1988). Estudos anteriores mostram que a região *psbA-trnH* tem uma capacidade discriminativa superior para detectar variações em grupos taxonômicos, o que pode explicar a formação de linhagens adicionais (Bolson *et al.*, 2015; Kress *et al.*, 2005; Lahaye *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2012).

Além disso, um estudo realizado por Lima *et al.* (2023) provou a existência de potenciais híbridos entre *P. emarginatus* e *P. pubescens*. Os autores afirmaram que *P. emarginatus* parece estar distribuído ao norte do Cerrado e *P. pubescens* ao sul, apresentando uma distribuição latitudinal de contato entre eles, formando assim zonas de contato. Rocha (2006) encontrou indivíduos vivendo na mesma faixa latitudinal observada por Lima *et al.* (2023), os quais exibem características morfológicas e composição genética intermediárias entre as duas espécies. Estas zonas de contato abriram espaço para o estudo da produção de híbridos e do fluxo gênico interespecífico. Os experimentos de polinização interespecífica realizados por Lima *et al.* (2023) mostraram que não há barreiras reprodutivas entre as espécies, permitindo a formação de frutos e sementes. Entretanto, a baixa frequência de retrocruzamentos e híbridos sugere que as barreiras são principalmente de caráter ecológico. As populações de *P. pubescens* ocorrentes em Nova Xavantina (MT), Pontalina (GO) e Araguaiana (MT), apresentaram haplótipos únicos entre as populações de *P. pubescens*, elas estão inseridas próximas às zonas de contato descritas entre *P. emarginatus* e *P. pubescens* sugeridas

por Lima *et al.* (2023). Nessas três populações, é provável que ocorram formação de híbridos, fruto do fluxo gênico interespecífico, o que pode estar promovendo o surgimento de linhagens geneticamente diferenciadas.

Assim, a complexidade da estrutura em *Pterodon* sugere que análises utilizando marcadores intergênicos é essencial para uma compreensão mais precisa das relações evolutivas entre espécies. Portanto, recomendamos novas tentativas de DNA *barcode* com a região intergênica de DNA nuclear ITS como a sintetização de *primers* novos.

Ademais, vale ressaltar que este estudo incluiu apenas um gênero com mais de uma espécie representante. Expandir a amostragem de táxons, incluindo mais de uma espécie por gênero, poderia enriquecer a investigação de DNA *barcode*. Isso permitiria avaliar se o padrão observado em espécies congêneres como *P. emarginatus* e *P. pubescens*, que possuem relações filogenéticas muito próximas, se repetiria em outros gêneros (Bolson, 2012).

Mesmo com suas limitações, todos os marcadores de DNA *barcode* foram capazes de identificar indivíduos, ao menos em nível de gênero. Em diversos casos, a identificação da família ou gênero já é suficiente para a maioria das ações de fiscalização como as plantas listadas na CITES (*e.g. Dipteryx*) (Hollingsworth *et al.* 2011). Neste contexto, o DNA *barcode* se torna uma ferramenta útil para fiscalização do comércio de espécies ameaçadas de extinção.

Além disso, os dados gerados nesta pesquisa serão depositados na plataforma BOLD *System*, visando ampliar a representatividade de plantas e contribuir com o banco de dados de identificação molecular.

5. CONCLUSÃO

Foi possível constatar que o marcador *psbA-trnH* tem potencial para diagnósticos a nível de espécie, enquanto *matK*, *rbcL* e as duas regiões combinadas são mais adequados para discriminação a nível de gênero. Enfatizamos ainda a necessidade de alimentar os bancos de dados, principalmente o BOLD, que servem como uma biblioteca de comparação para a identificação molecular de espécies.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* *Amburana cearensis*: uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, p. 1-8, 2010.

- ANTIL, S. *et al.* DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. **Molecular Biology Reports**, v. 50, p. 761-775, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>.
- BAVARESCO, O. S. A. *et al.* Utilização popular da *Pterodon spp.* no tratamento de doenças reumáticas. **Biomedical Research Journal**, v. 8, p. 81, 2016. DOI: <https://doi.org/10.24863/rib.v8i1.32>.
- BENTHAM, G. Synopsis of Dalbergieae, a tribe of Leguminosae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 4, p. 1-128, 1860. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1860.tb02464.x>.
- BERNAL-GALLARDO, J. J.; DE FOLTER, S. Plant genome information facilitates plant functional genomics. **Planta**, v. 259, p. 1-12, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-024-04397-z>.
- BOLSON, M. **Identificação de espécies arbóreas da floresta ombrófila mista através da técnica de DNA barcode**: Aplicação de DNA Barcoding em espécies vegetais arbóreas da floresta ombrófila mista. 2012. 144. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, 2012.
- BOLSON, M. *et al.* ITS and trnH-psbA as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. **PLOS ONE**, v. 10, p. 1-18, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143049>.
- CAMILLO, J. *et al.* Grupos de uso e as espécies prioritárias. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Orgs.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro**: região Centro-Oeste. Brasília: MMA, 2016. p. 861-874.
- CAHYANINGSIH, R. *et al.* DNA barcoding medicinal plant species from Indonesia. **Plants**, v. 11, p. 1-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11101375>.
- CARDOSO, D. *et al.* Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 58-75, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.05.001>.
- CARVALHO, C. S.; CARDOSO, D. B. O. S.; LIMA, H. C. *Pterodon emarginatus*. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico, Rio de Janeiro, 2024a. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB29843>. Acesso em: 18 set. 2024.
- CARVALHO, C. S.; CARDOSO, D. B. O. S.; LIMA, H. C. *Pterodon pubescens*. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico, Rio de Janeiro, 2024b. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB29842>. Acesso em: 18 set. 2024.
- CARVALHO, C. S.; LIMA, H. C.; LEMES, M. R.; CARDOSO, D. Andean uplift, climatic events, and rainforest bridges determined the spatiotemporal evolution of the cumaru and tonka beans (Dipterygeae: Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 206, p. 126–140, 2024. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boae015>
- CARVALHO, P. E. R. Cumaru: *Amburana cearensis*. In: CARVALHO, P. E. R. (Org.). **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Portal Embrapa, 2003. p. 433-439.
- CARVALHO, P. E. R.; GAIAD, S. **Espécies Arbóreas Brasileiras: Fabaceae**. Brasília: Portal Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/especies-arboreas-brasileiras/fabaceae>. Acesso em: 21 jun. 2024.

CBOL PLANT WORKING GROUP; HOLLINGSWORTH, P. M. *et al.* DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 12794-12797, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>.

CBOL CHINA PLANT WORKING GROUP; LI, D.-Z. *et al.* Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 19641-19646, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1104551108>.

CHASE, M. W. *et al.* Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 360, p. 1889-1895, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1720>.

CHEN, S. *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **PLOS ONE**, v. 5, e8613, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>.

COELHO, L. P. *et al.* Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 109-116, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.014>.

CORLETTI, R. T. Plant diversity in a changing world: status, trends, and conservation needs. **Plant Diversity**, v. 38, p. 10-16, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>.

COVILLE, F. V. **The Century Dictionary and Cyclopaedia**. Vol. 11 (Suppl.). New York: The Century Co., 1910. 754 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 12, p. 3-15, 1987.

FAZEKAS, A. J. *et al.* Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. **PLOS ONE**, v. 3, p. 1-12, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>.

FLORA DO BRASIL. Fabaceae. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico, Rio de Janeiro, 2024. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB115>. Acesso em: 20 set. 2024.

FORMENTÃO, L.; SARAIVA, A. S.; MARRERO, A. R. DNA barcoding exposes the need to control the illegal trade of eggs of non-threatened parrots in Brazil. **Conservation Genetics Resources**, v. 13, p. 275-281, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01209-4>.

FROLDI, G. *et al.* *Pterodon emarginatus* seed preparations: antiradical activity, chemical characterization, and in silico ADMET parameters of β -caryophyllene and farnesol. **Molecules**, v. 28, p. 7494, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28227494>.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14812-14817, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>.

HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **PLOS ONE**, v. 6, e19254, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>.

IUCN. The IUCN red list of threatened species, versão 2024-1. IUCN Red List Unit, Cambridge U.K., 2010. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 08 jun. 2024.

JIAO, L. *et al.* DNA barcoding for wood identification: global review of the last decade and future perspective. **IAWA Journal**, v. 41, p. 620-643, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1163/22941932-bja10041>.

KRESS, W. J. Plant DNA barcodes: applications today and in the future. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, p. 291-307, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jse.12254>.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. **PLOS ONE**, v. 2, e508, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>.

KRESS, W. J. *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 8369-8374, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>.

LAHAYE, R. *et al.* DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 2923-2928, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.070993610>.

LI, X. *et al.* Plant DNA barcoding: from gene to genome. **Biological Reviews**, v. 90, p. 157-166, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12104>.

LIMA, S. L. **Filogeografia de *Pterodon emarginatus* e *Pterodon pubescens* (Leguminosae)**. 118 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

LIMA, V. F. M. *et al.* Genetic and reproductive evidence of incomplete isolation barriers between *Pterodon emarginatus* and *P. pubescens* (Leguminosae, Papilionoideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 37, p. 1-13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1677-941X-ABB-2022-0253>.

LINDLEY, J. Fabaceae Lindl. In: **An Introduction to the Natural System of Botany**. 2. ed. 1836. p. 148.

KAWAKAMI, M. Y. M. *et al.* Efficacy of nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oleoresin for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 134, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111109>.

MEIKLEJOHN, K. A.; DAMASO, N.; ROBERTSON, J. M. Assessment of BOLD and GenBank – Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. **PLOS ONE**, v. 14, p. 1-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217084>.

MORAES, W. F. *et al.* Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 202-207, 2012.

NABOUT, J. *et al.* Combining multiple models to predict the geographical distribution of the Baru tree (*Dipteryx alata* Vogel). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 911-919, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842010000500001>.

- PALMER, J. D.; HERBON, L. A. Plant mitochondrial DNA evolved rapidly in structure, but slowly in sequence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 28, p. 87–97, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02143500>.
- PANG, X. *et al.* Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 7, p. 1-9, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>.
- PAREYN, F. G. C. *et al.* Madeireiras. In: CORADIN, C.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro região Nordeste**. Brasília: MMA, 2018. p. 772-779.
- PESSOA, A. C. B. P.; OLIVEIRA, A. F. M. Aromáticas. In: CORADIN, C.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília: MMA, 2018. p. 341-346.
- POSADA-LÓPEZ, L. *et al.* Improving the COI DNA barcoding library for Neotropical phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). **Parasites and Vectors**, v. 16, p. 1-12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05807-z>.
- PUIILLANDRE, N. *et al.* ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 1864–1877, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>.
- RAJARAM, M. C. *et al.* DNA barcoding of endangered *Paphiopedilum* species (Orchidaceae) of peninsular Malaysia. **Phytotaxa**, v. 387, p. 94–104, 2019. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.387.2.2>.
- ROCHA, D. M. S. **Aspectos taxonômicos, genéticos e reprodutivos de *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae, Dipteryxaceae)**. 2006. 134. Tese de doutorado - Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- ROZAS, J. *et al.* DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299-3302, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
- SAHU, A. *et al.* Environmental DNA (eDNA): Powerful technique for biodiversity conservation. **Journal for Nature Conservation**, v. 71, p. 1-14, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2022.126325>.
- SANG, T.; CRAWFORD, D. J.; STUESSY, T. F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 84, p. 1120-1136, 1997. DOI: <https://doi.org/10.2307/2446155>.
- SANO, S. M.; BRITO, M. A.; RIBEIRO, J. F. Alimentícias. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2016, p. 203-215.
- SELEME, E. P. *Amburana*. Flora e Funga do Brasil, Jardim Botânico, Rio de Janeiro, 2024. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22781>. Acesso em: 24 jul. 2024.
- SMITH, A. C. Notes on the genus *Amburana* Schwacke & Taub. (*Torresea* Fr. Allem.). **Tropical Woods**, v. 62, p. 30, 1940.

- SUN, Y.; SKINNER, D. Z.; LIANG, G. H.; HULBERT, S. H. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 26-32, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF00226978>.
- TAKEMOTO, E.; OKADA, I. A.; GARBELLOTTI, M. L.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 113-117, 2001.
- TATE, J. A.; SIMPSON, B. B. Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. **Systematic Botany**, v. 28, p. 723-737, 2003. <https://doi.org/10.1043/02-64.1>.
- TECHEN, N. *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 103-110, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.010>.
- VOGEL, T. H. Des Caesalpinieis Brasiliae. *Dipteryx alata*. **Linnaea**, v. 11, p. 383-384, 1837.
- VOGEL, T. H. Des Caesalpinieis Brasiliae. *Pterodon emarginatus*. **Linnaea**, v. 11, p. 384-385, 1837.
- ZHANG, D. *et al.* Internal Transcribed Spacer (ITS), an ideal DNA Barcode for species discrimination in *Crawfordia wall.* (Gentianaceae). **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 13, p. 101-106, 2016. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i6.15>.
- ZOU, S. *et al.* How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-13, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep36822>.